



<p>(51) 国際特許分類6 C07K 14/82, 7/00, C12N 15/00, A61K 39/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/06602</p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月10日(10.02.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04130</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月30日(30.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/218093 1998年7月31日(31.07.98)</p> <p>(71) 出願人; および (72) 発明者 杉山治夫(SUGIYAMA, Haruo)[JP/JP] 〒562-0036 大阪府箕面市船場西2-19-30 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 岡 芳弘(OKA, Yoshihiro)[JP/JP] 〒584-0072 大阪府富田林市高辺台3-4-42-202 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: CANCER ANTIGENS BASED ON TUMOR SUPPRESSOR GENE WT1 PRODUCT</p> <p>(54)発明の名称 癌抑制遺伝子WT1の産物に基づく癌抗原</p> <p>(57) Abstract Cancer antigens containing as the active ingredient a Wilms' tumor suppressor gene WT1 product or a peptide consisting of 7 to 30 consecutive amino acids in the amino acid sequence of the above gene containing an anchor amino acid binding to major histocompatibility complex (MHC) class I, and cancer vaccines containing the same.</p>		

(57)要約

W i l l m s 腫瘍癌抑制遺伝子 W T 1 の産物、又は該アミノ酸配列中、主要組織適合性抗原 (M H C) クラス I との結合のアンカーアミノ酸を含む連続する 7 ~ 3 0 個のアミノ酸から成るペプチドを有効成分とする癌抗原、及びそれを含む癌ワクチン。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EES	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FR	フランス	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AT	オーストリア	GB	英国	LK	スリランカ	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GDB	グレナダ	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレンダ	LS	レソト	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GHA	ガーナ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GH	ギニア	LV	ラトヴィア	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ギニアビサウ	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
CA	カナダ	HC	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	YC	ニューギニア
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

癌抑制遺伝子 W T 1 の産物に基づく癌抗原

技術分野

本発明は、W i l m s 腫瘍の癌抑制遺伝子 W T 1 の産物に基づく癌抗原に関する。この癌抗原は、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、又は固形癌、例えば胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等、並びにさらには W T 1 を発現するすべての癌に対する抗癌ワクチンとして有用である。

背景技術

異物を排除するための免疫機構には、一般に、抗原を認識して抗原提示細胞として機能するマクロファージ、該マクロファージの抗原提示を認識して種々のリンホカインを産生して他の T - 細胞等を活性化するヘルパー T - 細胞、該リンホカインの作用により抗体産生細胞に分化する B - リンパ球等が関与する液性免疫と、抗原の提示を受けて分化したキラー T - 細胞が標的細胞を攻撃し破壊する細胞性免疫とがある。

現在のところ、癌の免疫は主として、キラー T - 細胞が関与する細胞性免疫によるものと考えられている。キラー T - 細胞による癌免疫においては、主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex ; MHC) クラス I と癌抗原との複合体の形で提示された癌抗原を認識した前駆体 T - 細胞が分化増殖して生成したキラー T - 細胞が癌細胞を攻撃し、破壊する。この際、癌細胞は M H C クラス I 抗原と癌抗原との複合体をその細胞表面に提示しており、これがキ

ラー T - 細胞の標的とされる (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev, 146, 167, 1995)。

標的細胞である癌細胞上に MHC クラス I 抗原により提示される前記の癌抗原は、癌細胞内で合成された抗原蛋白質が細胞内プロテアーゼによりプロセッシングされて生成した約 8 ~ 12 個のアミノ酸から成るペプチドであると考えられている (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995)。

現在、種々の癌について抗原蛋白質の検索が行われているが、癌特異抗原として証明されているものは少ない。

W i l m s 腫瘍の癌抑制遺伝子 W T 1 (W T 1 遺伝子) は、W i l m s 腫瘍、無紅彩、泌尿生殖器異常、精神発達遅滞などを合併する W A G R 症候群の解析から W i l m s 腫瘍の原因遺伝子の 1 つとして染色体 11 p 13 から単離された (Gessler, M. ら、Nature, Vol. 343, p. 774-778 (1990)) ものであり、ゲノム DNA は約 50 kb で 10 のエキソンから成り、その cDNA は約 3 kb である。cDNA から推定されるアミノ酸配列は、配列番号: 1 に示す通りである (Mol. Cell. Biol., 11, 1707, 1991)。

W T 1 遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞を W T 1 アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される (特開平 9 - 104627 号公報) ことなどから、W T 1 遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、W T 1 遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており (特願平 9 - 191635)、W T 1 遺伝子は白血病及び固形癌における新しい腫瘍マーカーであるこ

とが判明した。しかしながら、WT 1 遺伝子発現生成物が癌ワクチンとして有用な癌特異抗原であることは立証されていない。

発明の開示

従って本発明は、WT 1 遺伝子発現生成物が癌抗原である可能性を確認し、新規な癌抗原を提供しようとするものである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、WT 1 遺伝子の発現生成物のアミノ酸配列中で、マウス及びヒトのMHCクラスI及びMHCクラスIIとの結合において、アンカーアミノ酸として機能すると予想される少なくとも1個のアミノ酸を含有する連続する7～30個のアミノ酸から成るポリペプチドを合成し、これらのペプチドがMHC蛋白質と結合することを確認すると共に、MHCクラスI抗原と結合した場合にキラーT-細胞を誘導し、且つ標的細胞に殺細胞効果を及ぼすことを確認して本発明を完成した。

従って本発明は、マウスWT 1 発現産物、又はその部分を含んで成る癌抗原を提供する。好ましい態様において、本発明は、WT 1 のcDNAに対応する配列番号：1に示すアミノ酸配列において、MHC抗原との結合のためのアンカーアミノ酸を含む6～30個のアミノ酸から成るペプチドを活性成分とする癌抗原を提供する。

さらに、本発明は、ヒトWT 1 のcDNAに対応する配列番号：2に示すアミノ酸配列において、MHC抗原との結合のためのアンカーアミノ酸を含む7～30個のアミノ酸から成るペプチドを活性成分とする癌抗原を提供する。

本発明はまた、上記の癌抗原を含んで成る癌ワクチンを提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 1 における、D^b 126 ペプチドで免疫した細胞と非免疫細胞のフローサイトメトリーにおける CD 4⁺ 細胞と CD 8⁺ 細胞の比率を示すグラフである。

図 2 は、実施例 2 における、D^b 126 ペプチドにより免疫した細胞の、D^b 126 ペプチドでパルスした標的細胞とパルスしていない標的細胞に対する殺細胞作用を比較したグラフである。

図 3 は、図 2 と同じ意味のグラフである。

図 4 において、A は、実施例 3 における、D^b 126 ペプチドを用いて誘導した CTL の、D^b 126 ペプチドをパルスした T 2 細胞に対する殺細胞効果を示し、B は実施例 3 における、WH 187 ペプチドを用いて誘導した CTL の、WH 187 ペプチドをパルスした T 2 細胞に対する殺細胞効果を示すグラフである。

図 5 は、D^b 126 ペプチドにより誘導された CTL の表面マーカーを FACS により解析した結果を示すチャートである (CD 19 細胞及び CD 3 細胞)。

図 6 は、CD 4 細胞及び CD 8 細胞についての、図 5 と同様のチャートである。

図 7 は、CD 56 細胞についての図 5 と同様のチャートである。

図 8 は、WH 187 ペプチドにより誘導した CTL の表面マーカーを FACS により解析した結果を示すチャートである (CD 19 細胞及び CD 3 細胞)。

図 9 は、CD 4 細胞及び CD 8 細胞についての、図 8 と同様のチャートである。

図 10 は、CD 56 細胞についての、図 8 と同様のチャートである。

図 11 は、D^b 126 ペプチド特異的 CTL による、D^b 126 ペプ

チドをパルスした T 2 細胞に対する特異的細胞溶解に対する抗 H L A - A 2 . 1 抗体の影響を示すグラフである。

図 1 2 は、W T 1 を発現している標的細胞又は W T 1 を発現していない標的細胞に対する、D^b 126 ペプチド特異的 C T L の細胞溶解活性を比較したグラフである。a は E : T 比が 7 . 5 : 1 の場合の結果を示し、b は E : T 比が 1 5 : 1 の場合の結果を示す。

図 1 3 は、生来的に W T 1 を発現する腫瘍細胞 (F B L 3) 及び W T 1 を発現しない腫瘍細胞 (R M A) に対する、D^b 126 ペプチド特異的 C T L の細胞溶解効果を比較したグラフである。

図 1 4 は、W T 1 遺伝子により形質転換された細胞及び形質転換されていない同じ細胞に対する、D^b 126 ペプチド特異的 C T L の細胞溶解効果を比較したグラフである。

図 1 5 は、D^b 126 ペプチド特異的 C T L の細胞毒性に対する、抗 H - 2 クラス I 抗体の影響を示すグラフである。

図 1 6 は、D^b 126 ペプチドをワクチンとして使用してマウスを免疫した場合の、インビボ免疫効果を示すグラフである。

図 1 7 は、W T 1 を発現するプラスミドを D N A ワクチンとしてマウスに投与した場合の免疫効果を示すグラフである。

図 1 8 は、図 1 7 の対照であって、W T 1 を発現しないプラスミドを投与した場合に免疫効果が生じないことを示すグラフである。

発明の実施の形態

本発明においては、癌抗原ペプチドを設計する際の基礎として、マウス M H C クラス I の K^b 及び D^b、並びにヒト H L A の A * 0 2 0 1 を選択し、これらと高い親和性を有すると予想されるペプチドを選択した。

Immunogenetics Vol. 41, p. 178-228 (1995) の記載から、K^b へ

の結合のアンカーアミノ酸として5番目のP h e及びT r y並びに8番目のL e u及びM e t等が予想され、またD^bへの結合のアンカーアミノ酸として5番目のA s n並びに9番目のM e t及びI l e等が予想される。

また、癌細胞の表面においてM H CクラスIにより提示される癌抗原ペプチドのサイズはおよそ8～12個であることが知られている。従って、本発明の癌抗原ペプチドは、配列番号：1に示すW T 1遺伝子産物のアミノ酸配列において、アンカーアミノ酸を含む、連続する7～30個のアミノ酸から成るペプチドである。アミノ酸の数は好ましくは8～12個であり、例えば8又は9個である。

本発明においては、その具体例として、M H CクラスIのK^bに結合するペプチドとして、アミノ酸8個からなる下記ペプチド：

K^b 45 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (配列番号：3)

K^b 330 Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (配列番号：4)

M H CクラスIのD^bに結合するペプチドとして、アミノ酸9個から成る下記のペプチド：

D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：5)

D^b 221 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (配列番号：6)

D^b 235 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

を使用した。上記配列において下線を付したアミノ酸がアンカーとして機能すると予想されるアミノ酸である。

次に、これらのペプチドの内、K^b 45及びK^b 330についてはM H CクラスIのK^bとの結合性を、D^b 126、D^b 221及びD^b 235についてはM H CクラスIのD^bとの結合性を、抗原ペプチドを提示していないが(e m p t y)、K^b及びD^bは発現されているセルライン(R M A - S)を用いて測定した。

すなわち、R M A - Sを26℃にて培養してM H CクラスIを高

発現せしめ、この培養細胞を被験ペプチド溶液と 37℃にて1時間インキュベートした。これにより、ペプチドと結合しないMHC分子は不安定になって細胞表面から消失し、ペプチドを結合したMHCクラスI分子のみが残る。次に、MHCクラスI (K^b, D^b) を認識する蛍光標識モノクローナル抗体によりRMA-S細胞を染色した。最後に、FACS解析により、細胞当りの平均蛍光量から結合解離定数を計算した (Immunol. Lett., 47, 1, 1995)。

その結果、次の結果が得られた。

K ^b 45	- 4. 5 7 8 4 8 3 8 (log)
K ^b 330	- 5. 7 6 1 7 7 3 2
D ^b 126	- 6. 2 8 3 4 9 6 8
D ^b 221	- 5. 7 5 4 5 3 9 8
D ^b 235	- 6. 1 4 5 7 6 2 4

以上の通り、いずれもK^b又はD^bと強～中程度の結合親和性 (kd値) を有しているが、最も高い結合親和性を示すD^b 126ペプチドを以後の実験において用いた。

また、ヒトについては、Immunogenetics Vol. 41, p. 178-228 (1995) の記載から、ヒトのHLA-A* 0201への結合アンカーアミノ酸として、N-末端から2番目のLeu及びMet、並びにN-末端から9番目のVal及びLeuが予想される。そこで、ヒトWT1蛋白質のアミノ酸配列 (Mol. Cell. Biol. Vol. 11, p. 1707-1712, 1991) (配列番号: 2) 中で、上の条件に合致する、9個のアミノ酸から成る2種類のペプチドを合成した。

D^b 126: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号: 5)
(マウスにおけるD^b 126の配列と同じ)

WH 187: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号: 8)
(下線はアンカーアミノ酸を示す。)

上記ペプチドと、HLA-A*0201との結合能を次のようにして測定した。

上記ペプチドと、emptyなHLA-A*0201をもつT2細胞(J. Immunol., 150, 1763, 1993; Blood, 88, 2450, 1996)を37℃、1時間インキュベート後、HLA-A2.1を認識する蛍光標識モノクローナル抗体で、T2細胞を染色し、FACS解析で、細胞当りの平均蛍光量から結合解離定数を計算した。

結 合 能

ペプチド	K _d (M)
D ^b 126	1.89×10^{-5}
WH 187	7.61×10^{-5}

2種類のペプチドは、ともに中等度以上の結合親和性を有する。

ヒトMHCに対応するペプチドとして、上記D^b126及びWH187を用いて、以下の実験を行った。

本発明はまた前記抗原を有効成分とする癌ワクチンに関する。このワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防又は治療のために使用することができる。このワクチンは、経口投与、又は非経口投与、例えば腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与、鼻腔内投与等により投与することができる。

さらに、本発明のワクチンの投与方法として、患者の末梢血から単核球を集め、その中から樹状細胞を取り出し、本発明のペプチドをパルスして患者に皮下投与などで患者に戻す方法も行われる。

ワクチンは、前記有効成分としての投与ペプチドのほかに、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバンド、例えば

水酸化アルミニウムのごとき鉱物ゲル；リソレシチン、プルロニックポリオールのごとき界面活性剤；ポリアニオン；ペプチド；又は油乳濁液を含むことができる。あるいは、リポゾーム中へ混合し、又は多糖及び／又はワクチン中に配合される他の集合体を含むことができる。投与量は一般に、1日当り0.1 μ g \sim 1mg/kgである。

本発明はまた、上記のポリペプチドワクチンをコードするDNAもワクチン（DNAワクチン）として使用することができる。すなわち、WT1又はその部分をコードする核酸、好ましくはDNAを、適切なベクター、好ましくは発現ベクターに挿入した後、動物に投与することにより、癌免疫を生じさせることができる。その具体例を実施例9に示す。

実施例

次に、実施例により、本発明のペプチドが癌抗原及び癌ワクチンとして有用なことを、明らかにする。

実施例1

D^b126 ペプチド100 μ g、ブタ由来の乳酸脱水素酵素（LDH）200 μ g、及びフロイントの不完全アジュバント0.5mlをC57BL/6マウスの腹腔内に、1週毎に2回注射して免疫処理した。この免疫処理の1週間後にマウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞の浮遊液を調製した。他方、D^b126 ペプチドをパルスした同系マウスの放射線照射脾細胞を、ペプチド50 μ g/mlを含む溶液と37 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートし、抗原提示細胞とした。

前記の免疫処理した脾細胞と放射線照射した脾細胞を混合して、5日間共培養し、キラーT-細胞を誘導調製した。他方D^b126 ペプチドによりパルス（100 μ g/mlのペプチド溶液と37 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベート）した Europium ラベル EL-4 細胞（K

及び D^b を発現している) を標的細胞とし、通常の方法を用いて、次の操作により K i l l i n g アッセイを行った (表 1)。

その結果、D^b 126 をパルスした E L - 4 細胞を標的にした場合は、殺細胞効果が見られたが、D^b 126 をパルスしていない E L - 4 細胞標的した場合は、殺細胞効果はほとんど見られなかった。

表 1

	マウス A	マウス B
ペプチド +	76.6 %	37.2 %
ペプチド -	4.9 %	0.9 %

E / T 比 40 : 1

次に、K i l l i n g アッセイにより有意な殺細胞効果を示した脾細胞試料を、蛍光標識した抗 C D 4 抗体又は抗 C D 8 抗体で染色しフローサイトメトリーにより、C D 4 及び C D 8 の発現を解析した。

その結果、図 1 に示すごとく、非免疫対照細胞に比べて、D^b 126 ペプチドで免疫処理した脾細胞においては、キラー T - 細胞により代表される C D 8 + 細胞が増加し、ヘルパー T - 細胞等により代表される C D 4 + 細胞に対する C D 8 + 細胞の比率が逆転増加していた。

実施例 2

C 5 7 B L / 6 マウスの骨髄由来の樹状細胞 (d e n d r i t i c c e l l s ; D C) を次の様にして調製した。常法に従い、骨髄細胞を G M - C S F 存在下で培養し、骨髄由来樹状細胞を調製した (J. Exp. Med. 182, 255, 1995)。

7 日間培養した樹状細胞と 1 0 μ M の O V A I I (O v a l b u m

in II) 及び $1 \mu\text{M}$ の D^b 126 ペプチドと共に 3 時間インキュベートした後、洗浄した。

次に、C57BL/6 マウスの *foot pads* と *hands* とに上記 DC 細胞を皮内注射し、5 日目に所属リンパ節を取り出し、細胞浮遊液を調製した。他方、 D^b 126 ペプチドでパルスし、放射線照射した B7.1-RMA-S 細胞 (Co-stimulatory molecule である B7.1 をコードする遺伝子をトランスフェクトした RMA-S 細胞) を調製した。

次に、上記のリンパ節由来細胞浮遊液と B7.1-RMA-S 細胞とを混合して培養することによりインビトロで再刺激した。

次に、インビトロでの再刺激の 5 日目に、 ^{51}Cr でラベルした RMA-S 細胞を標的として Killing アッセイを行った。再刺激 5 日目に回収されたリンパ球全体の $1/8$ をエフェクター細胞として用いた時を、最大の E/T 比 (1.0) とした。

図 2 及び図 3 に示すごとく、 D^b 126 ペプチドにより免疫されたマウスのリンパ節由来のエフェクター細胞は、該ペプチドでパルスされた標的細胞を殺したのに対して、該ペプチドでパルスされない標的細胞は殺さなかった。

また、実施例 1 と同様にして行ったフローサイトメトリーで $\text{CD}4^+$ 細胞と $\text{CD}8^+$ 細胞の比を解析したところ、 $\text{CD}4 : \text{CD}8 = 1 : 1.4 \sim 1.7$ であり、非免疫マウス細胞 (対照) に比べて、 D^b 126 ペプチドで免疫されたマウス細胞においては、 $\text{CD}8^+$ 細胞が増加し、 $\text{CD}4^+$ 細胞 : $\text{CD}8^+$ 細胞の比 (対照細胞においては約 2 : 1) が免疫された細胞においては逆転していた。

実施例 3

ペプチド D^b 126 又は WH 187 ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) と 1 時間インキュベートした後放射線照射した T2 細胞 5×10^4 個と HLA-

A* 0201をもつ健常人の末梢単核球 1×10^6 個とを共培養した。一週間後、ペプチド ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) と1時間インキュベートした後に放射線照射したT2細胞を上記の共培養系に加え、再刺激を行なった。その翌日から、ヒトIL-2 (最終濃度 $100 \text{ JRU}/\text{ml}$) を培養液に加えた。

以後、ペプチドでパルス後に放射線照射されたT2細胞での刺激を5回くり返した後、ペプチドをパルスされたT2細胞、あるいは、ペプチドをパルスされていないT2細胞を標的にして、Killing assayを行なった。また、誘導されたCTLの表面マーカーをFACS解析した。

Killing assayは常法に従いEuropiumでラベルしたT2細胞にペプチドをパルスしたものを標的として行った。

Effector : Target比 (E/T ratio) は $10 : 1$

共培養時間 : 3時間

培養液中のペプチド濃度 : $5 \mu\text{g}/\text{ml}$

結果を図4に示す。図4のAはD^b126ペプチドを用いて誘導したCTLの、D^b126ペプチドをパルスしたT2細胞に対する殺細胞効果を示し、図4のBはWH187ペプチドを用いて誘導したCTLの、WH187ペプチドをパルスしたT2細胞に対する殺細胞効果を示す。

いずれの場合でも、ペプチドをパルスしたT2細胞に対してより強い殺細胞効果が見られた。

FACS解析の結果を図5～図10に示す。図5～7にD^b126ペプチドで誘導したヒトのCTLの結果を示し、ほとんどの細胞がCD8陽性であった。図8～図10はWH187ペプチドで誘導されたヒトのCTLの結果を示す。CD4陽性細胞とCD8陽性細胞が

ほぼ同数であった。

実施例 4

D^b 126 ペプチド特異的 C T L の細胞溶解活性の M H C 拘束性を試験するため、ペプチドでパルスした T 2 細胞に対する C T L の細胞毒性活性をブロックするために抗 H L A - A 2 . 1 モノクローナル抗体を用いた。D^b 126 ペプチドでパルスした T 2 細胞の特異的細胞溶解を 5 : 1 の E / T 比において、H L A - A 2 . 1 分子に対するブロッキングモノクローナル抗体 (B B 7 . 2) の存在下又は不存在下で測定した。

結果を図 1 1 に示す。この図において * 印は抗 H L A - A 2 . 1 モノクローナル抗体の代わりに抗 H - 2 K^b モノクローナル抗体を使用した結果を示す。この図から明らかな通り、6 0 μ g / ml の抗 H L A - A 2 . 1 モノクローナル抗体の添加により、細胞毒性は、T 2 細胞の細胞溶解のバックグラウンドまで低下した。アイソタイプが同じ無関係のモノクローナル抗体 (抗 H - 2 K^b モノクローナル抗体 Y 3) は T 2 細胞の溶解に効果を有しなかった。

実施例 5

D^b 126 ペプチド特異的 C T L が、生来的に W T 1 を発現する H L A - A 2 . 1 陽性白血病細胞を殺すことができるか否かを試験した。標的細胞として T F 1 細胞 (W T - 1 を発現し、H L A - A 2 . 1 陽性) 、 J Y 細胞 (W T 1 を発現せず、H L A - A 2 . 1 陽性) 、及び M o l t - 4 細胞 (W T 1 を発現し、H L A - A 2 . 1 陰性) を用い、7 . 5 : 1 (a) 又は 1 5 : 1 の E : T 比において、細胞毒性を測定した。

結果を図 1 2 に示す。D^b 126 ペプチド特異的 C T L は生来的に W T 1 を発現し H L A - A 2 . 1 陽性の白血病細胞 T F 1 に対して有意な細胞毒性を示したが、M o l t - 4 (W T 1 を発現し、H L

A - A 2. 1 - 陰性) 又は J Y 細胞 (W T 1 を発現せず、H L A - A 2. 1 - 陽性) に対してはバックグラウンドレベルの細胞溶解を示した。

実施例 6

D^b 126 ペプチド特異的 C T L が、生来的に W T 1 を発現する腫瘍細胞を認識しそして細胞溶解するか否かを試験した。W T 1 を発現する腫瘍細胞 (F B L 3) もしくは W T 1 を発現しない腫瘍細胞 (R M A) (図 1 3)、又は W T 1 遺伝子をトランスフェクトされた C 1 4 9 8 細胞もしくは T W 1 遺伝子をトランスフェクトされていない C 1 4 9 8 細胞 (図 1 4) について、特異的細胞溶解を図 1 3 及び図 1 4 に示す E / T 比において測定した。

図 1 3 に示す通り、D^b 126 ペプチド特異的 C T L は、生来的に W T 1 を発現する F B L 3 細胞を溶解したが W T 1 を発現しない R M A 細胞を溶解しなかった。図 1 4 に示す通り、さらに、D^b 126 ペプチド特異的 C T L は、W T 1 を発現しない親 C 1 4 9 8 細胞に比べて、マウス W T 1 遺伝子をトランスフェクトされた C 1 4 9 8 細胞を殺した。これにより、C T L による殺細胞のために標的化された分子が確かに W T 1 ペプチドであることが確認された。これらの結果は、D^b 126 ペプチド特異的 C T L が、W T 1 蛋白質の細胞内プロセッシングにより天然に産生され、そして W T 1 発現細胞の H - 2 D^b 分子上に存在する D^b 126 ペプチド又は関連ペプチドを認識することができることを示唆している。

実施例 7

C T L の細胞溶解活性が M H C 拘束性であるか否かを試験するため、H - 2 クラス I 分子に対する抗体の存在下で測定を行った。すなわち、D^b 126 ペプチド特異的 C T L による、D^b 126 ペプチドでパルスした R M A - S 細胞、H - 2 K^b (2 8 . 1 3 . 3 S)、

H-2D^b (28.11.5S) 又は H-2L^d (MA143) に対する、タイターを調整したモノクローナル抗体の存在下で試験した。対照モノクローナル抗体としてアイソタイプが一致したモノクローナル抗体を使用した。

結果を図15に示す。H-2D^b に対する抗体の濃度の増加に依存して、D^b 126 ペプチドでパルスした RMA-S 細胞に対する CTL の細胞溶解活性が抑制されたが、H-2K^b 又は H-2L^d に対する抗体は CTL の細胞溶解活性を抑制しなかった。これらの結果は、CTL が H-2D^b 拘束的に細胞溶解活性を発揮することを示している。

実施例 8

D^b 126 ペプチドによる積極的免疫化により生体内腫瘍免疫が惹起されるか否かを試験した。D^b 126 ペプチドによりパルスされた LPS 活性化脾細胞 (図16中の実線)、LPS 活性化脾細胞のみ (網線)、又はリン酸緩衝液のみ (PBS) (破線) により、1週間に1回マウスを免疫した。3週間の免疫の後、 3×10^7 個の FBL3 白血病細胞を腹腔内注射した。

結果を図16に示す。D^b 126 ペプチドにより免疫されたマウスは腫瘍チャレンジを克服しそして生存したが、非免疫マウス及び LPS 活性化脾細胞のみで免疫されたマウスは腫瘍チャレンジを拒絶することができず、死亡した。免疫されたマウス及び非免疫マウスの両方について、腫瘍細胞の前記腹腔内接種の後3日間で腹水が観察された。非免疫マウスにおいては腹水が増加し続け、そしてマウスは死んだ。他方、免疫マウスにおいては、腹水はその後徐々に減少し、マウスは腫瘍チャレンジを完全に拒絶し、そして生存した。非免疫マウスにおいて、自然的退行 (regression) が時々観察された。この退行は、Friend 白血病ウイルス (FBL

3 白血病細胞はこのウイルスにより形質転換される) に対して特異的なCTLの自然的誘導によるものと予想される。なぜなら、このようなCTL誘導は、C57BL/6マウスにおいて時おり観察されるからである。

実施例9 DNAワクチン

6～8週齢のC57BL/6マウスに、100 μ gのWT1を発現するプラスミッドDNA(マウスWT1 cDNA (Molecular and Cellular Biology, vol.11, No.3, p.1707-1712(1991), p.1709の左欄)のSun 3AI断片をCMV-IEプロモーターに連結し、WT1を持続発現するプラスミッドを作製)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 11105-11109(1995))を10日毎に、計3回筋肉注射した。最後の筋肉注射の10日後、マウスの脾を取り出し脾細胞を調整し、この脾細胞と、WT1を発現しているmWT1 C1498細胞(40Gy放射線照射)と6日間、37 $^{\circ}$ Cで共培養を行なった後、標的細胞として、WT1を発現しているC1498(PM5G-mWT1)とWT1を発現していないC1498(PM5G)を用いて、Killing assay (Europiumでラベル)を行った。なお、C1498はWT1を発現しないマウス骨髄性白血病細胞株である。

WT1を発現している、C1498(PM5G-mWT1)細胞を殺すが、WT1を発現していない細胞は殺さない細胞毒性Tリンパ球(CTL)が誘導された。

結果を図17に示す。

対照として、上記と同様の実験を行ったが、WT1を発現しているプラスミッドの代わりに、WT1を発現しない(WT1 cDNAをもたない)プラスミッドをマウスに筋肉注射した。上記の実験と同じように脾細胞を採取し、WT1を発現しているC1498(PM

5 G-mWT1) で *in vitro* 刺激後、Killing assay を行った。

図18に示す通り、WT1 cDNA をもたないコントロールプラスミッドDNA の筋肉注射からは、WT1 タンパク特異的CTL は誘導されなかった。

上記の結果から、本発明のペプチドは確かに癌抗原として機能し、癌細胞に対するキラーT細胞（癌細胞傷害性T細胞）を誘導増殖させたことが立証された。従って、本発明の癌抗原ペプチドは、WT1 遺伝子の発現の上昇を伴う白血病及び固形癌に対する癌ワクチンとして有用である。

請 求 の 範 囲

1. 癌抑制遺伝子WT1の産物又はその部分ペプチドを活性成分とする癌抗原。

2. 配列番号：1のアミノ酸配列において、MHC分子に結合するために必要なアンカーアミノ酸を含む、連続する7～30個のアミノ酸からなるペプチド、又は配列番号：2のアミノ酸配列において、MHC分子に結合するのに必要なアンカーアミノ酸を含む、連続する7～30個のアミノ酸から成るペプチド、を活性成分とする請求項1に記載の癌抗原。

3. 前記抗原が、癌抑制遺伝子WT1の高発現をもたらす癌の抗原である、請求項1又は2に記載の癌抗原。

4. 前記癌が、白血病、骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌又は卵巣癌である、請求項1又は2に記載の癌抗原。

5. 前記ペプチドが、

		G	A	S	A	Y	G	S	L		
K ^b	45	Gly	Ala	Ser	Ala	Tyr	Gly	Ser	Leu	(配列番号：3)	
		C	N	K	R	Y	F	K	L		
K ^b	330	Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	(配列番号：4)	
*	D ^b	R	M	F	P	N	A	P	Y	L	(配列番号：5)
		Y	S	S	D	N	L	Y	Q	M	
D ^b	221	Tyr	Ser	Ser	Asp	Asn	Leu	Tyr	Gln	Met	(配列番号：6)
*	D ^b	C	M	T	W	N	Q	M	N	L	(配列番号：7)
		S	L	G	E	Q	Q	Y	S	V	
WH	187	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Gln	Tyr	Ser	Val	(配列番号：8)

のいずれかである、請求項1～4のいずれかに記載の癌抗原。

6. 前記ペプチドが、

*	D ^b	R	M	F	P	N	A	P	Y	L	(配列番号：5)
		Arg	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	

、又は

WH 187 S L G E Q Q Y S V
Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号 : 8)

である、請求項 5 に記載の癌抗原。

7. 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の癌抗原を含んで成る癌ワクチン。

Fig.1

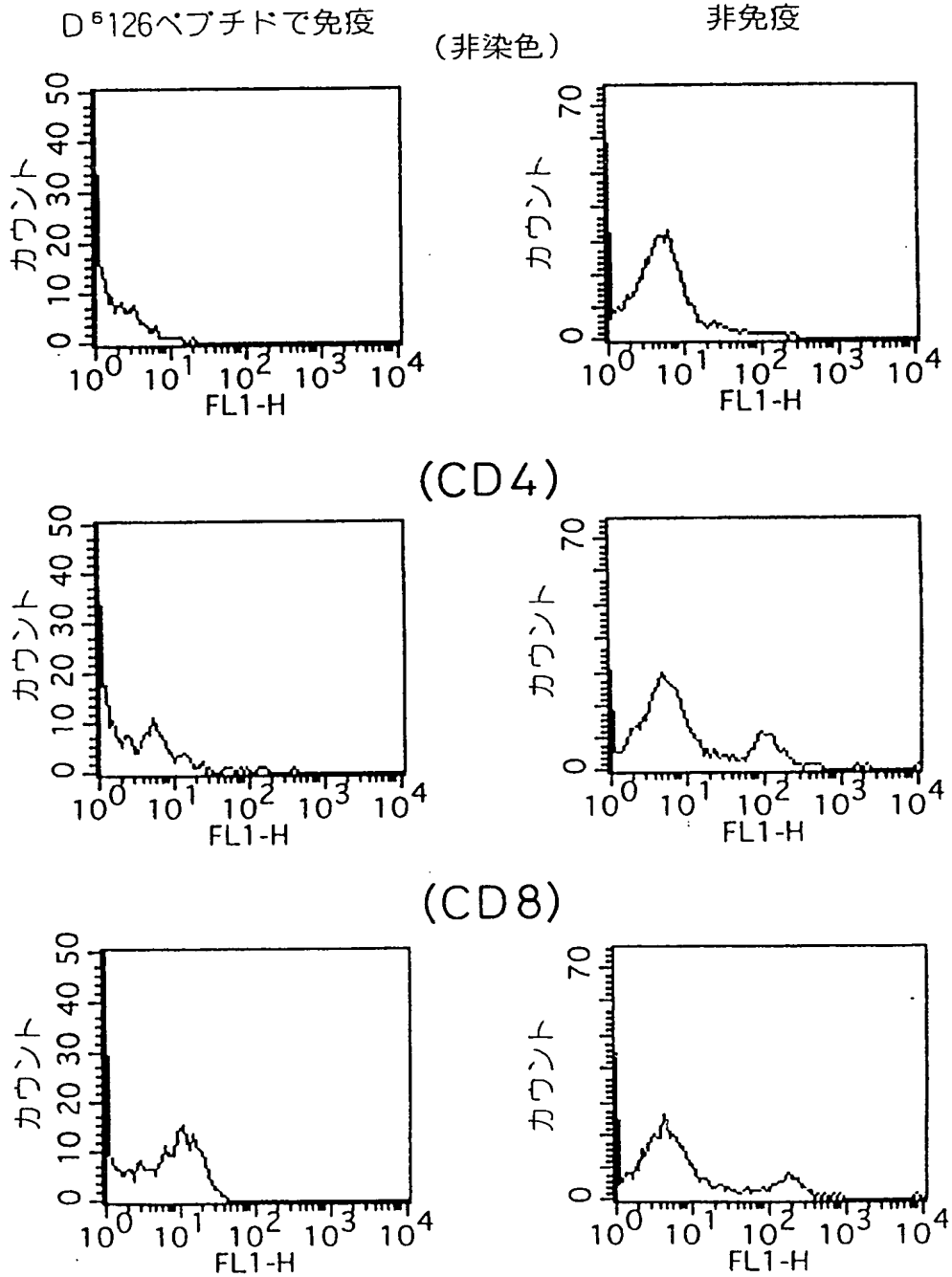
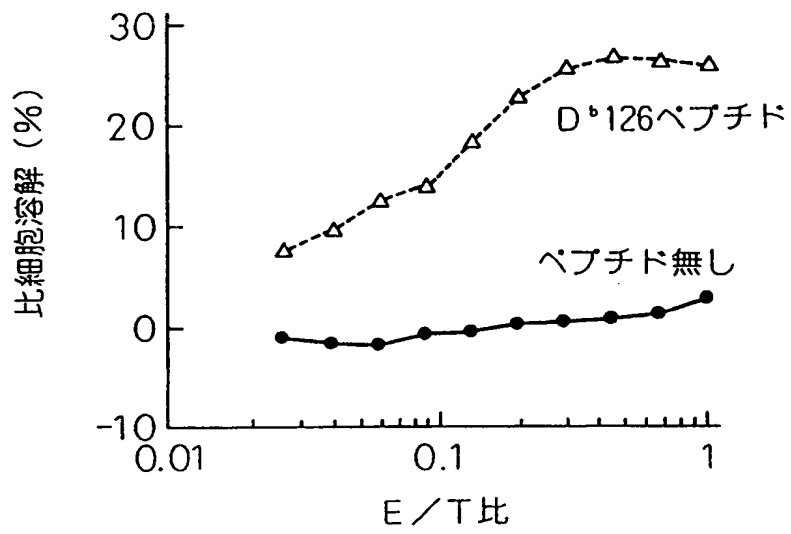


Fig.2

マウス1



マウス2

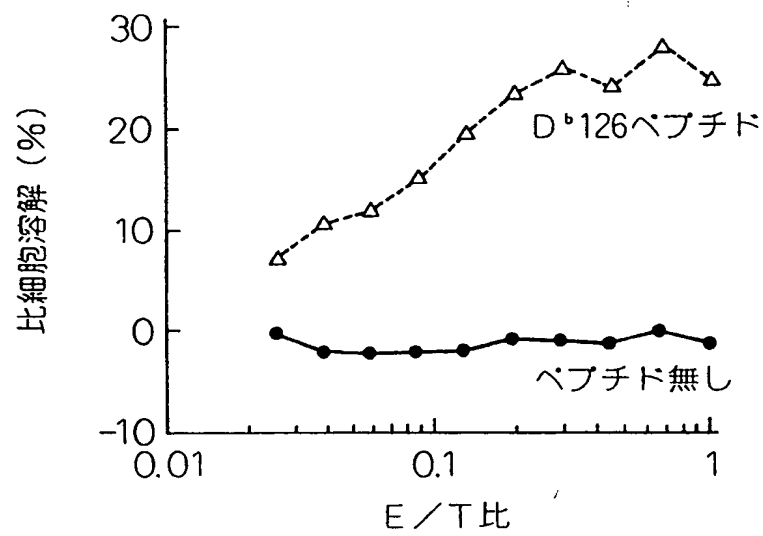
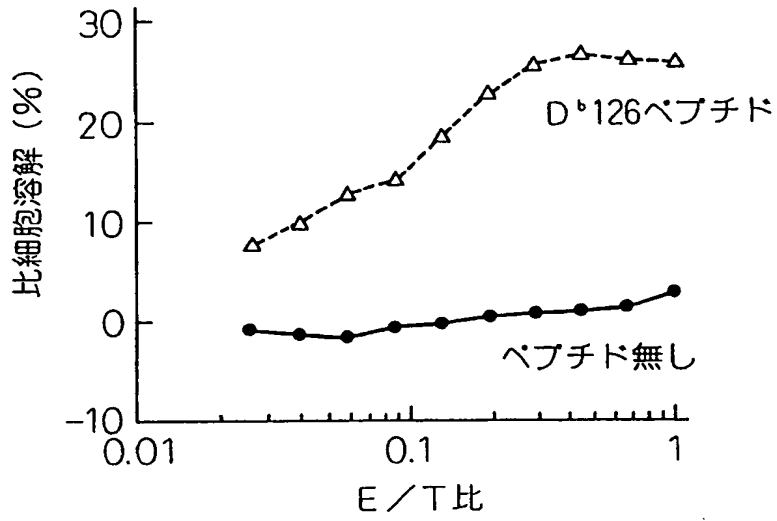


Fig.3

マウス3



マウス4

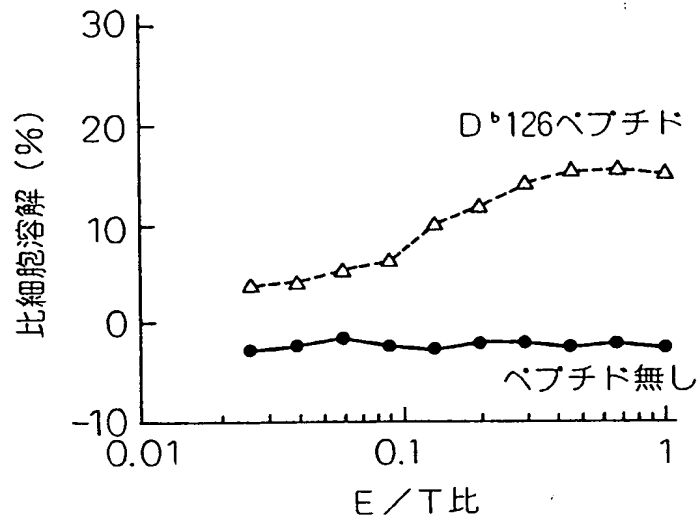


Fig. 4

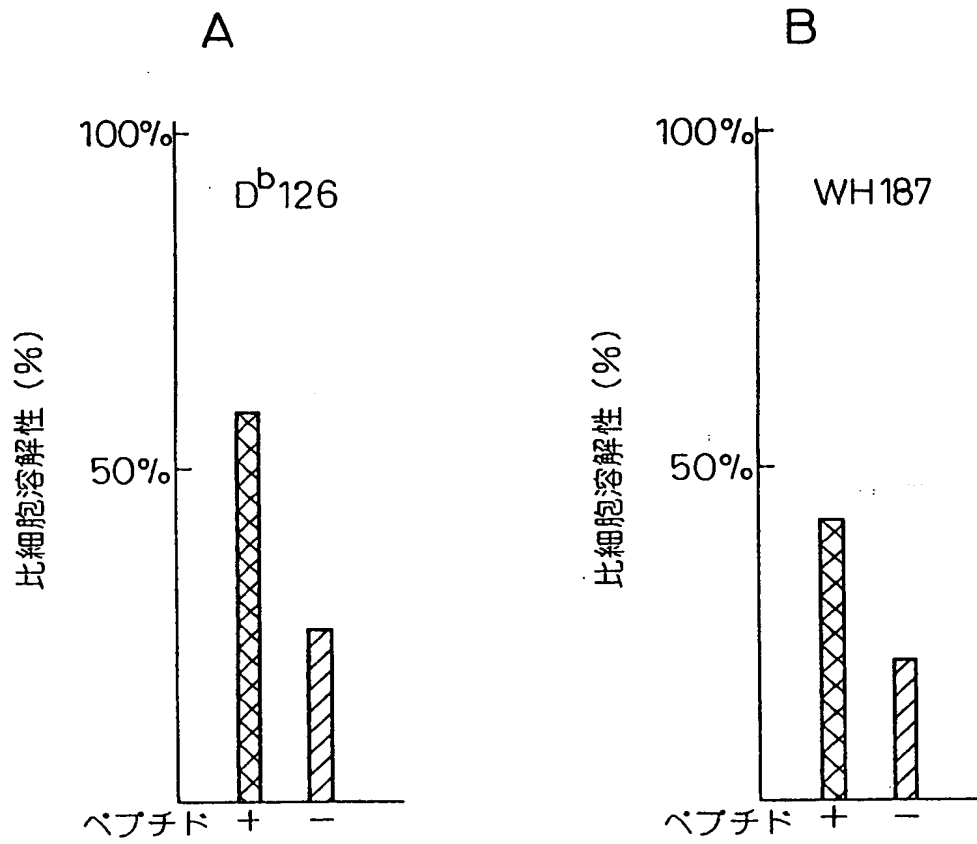


Fig.5

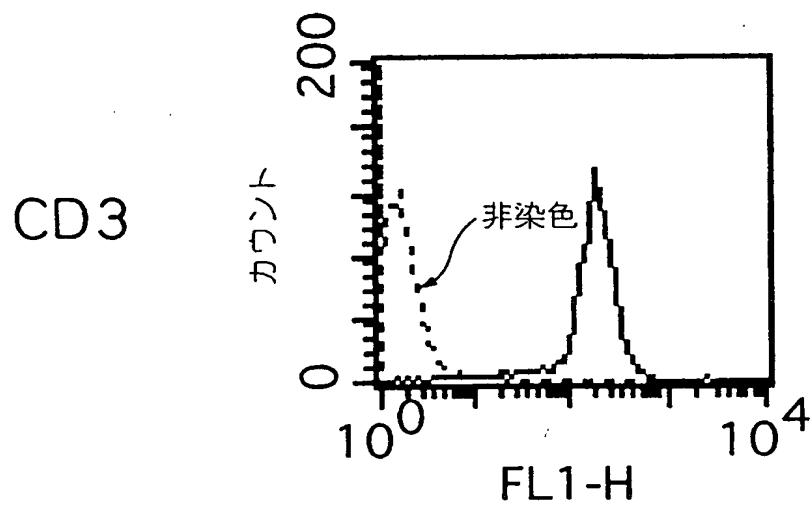
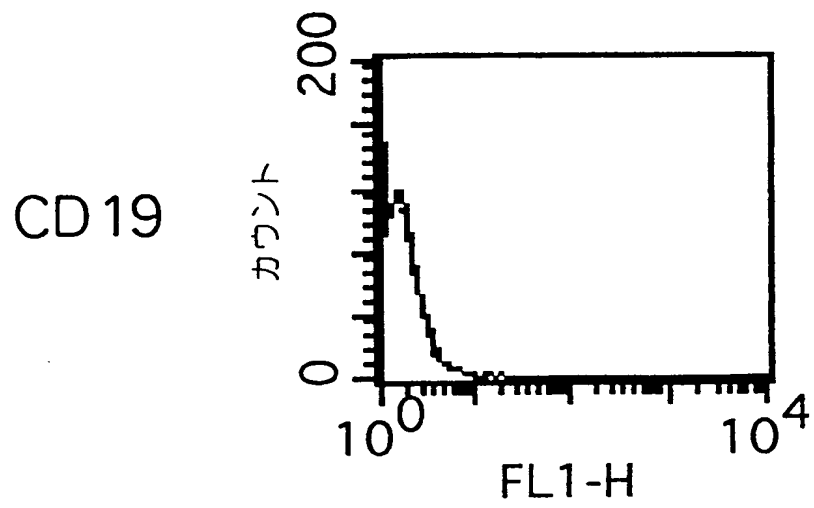


Fig.6

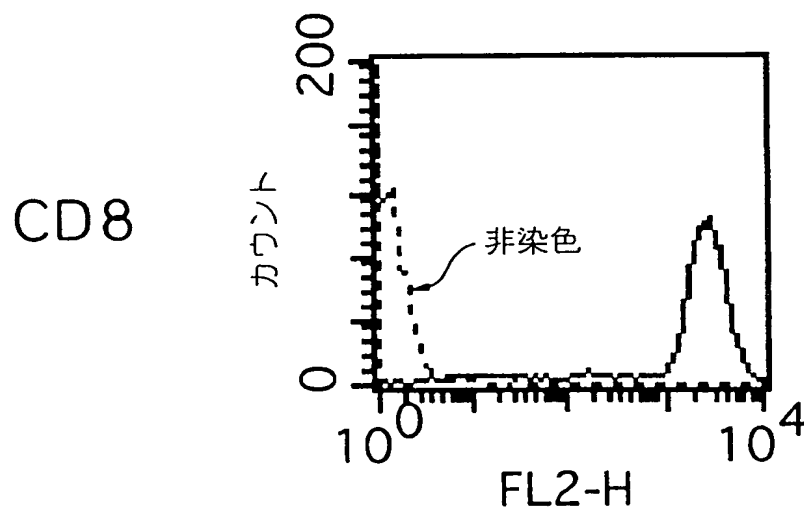
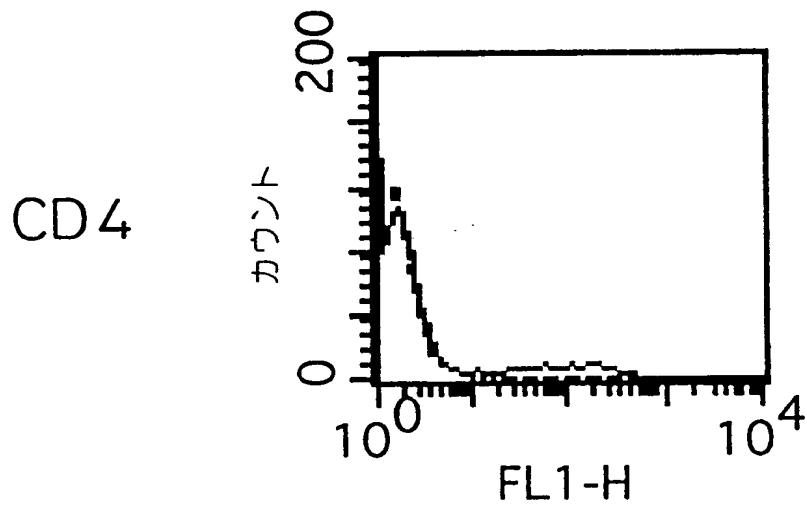


Fig.7

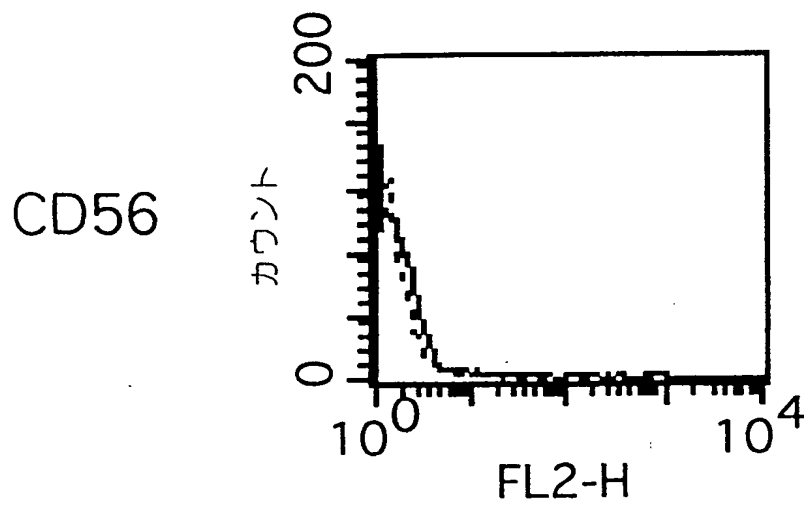


Fig.8

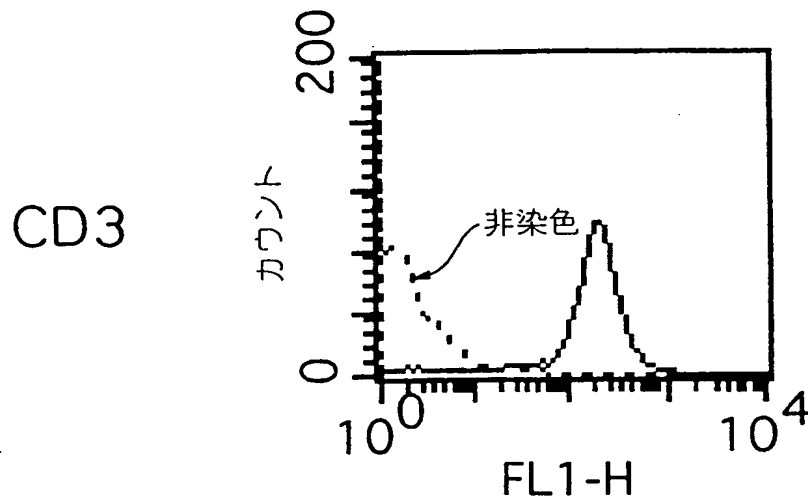
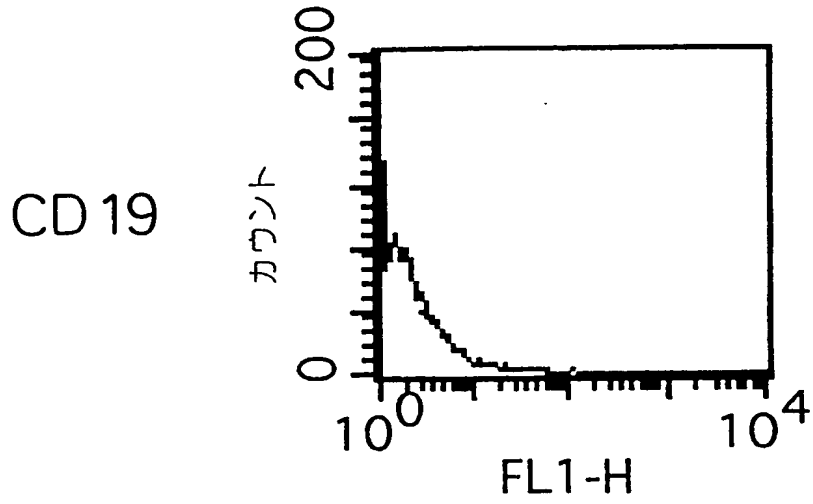


Fig. 9

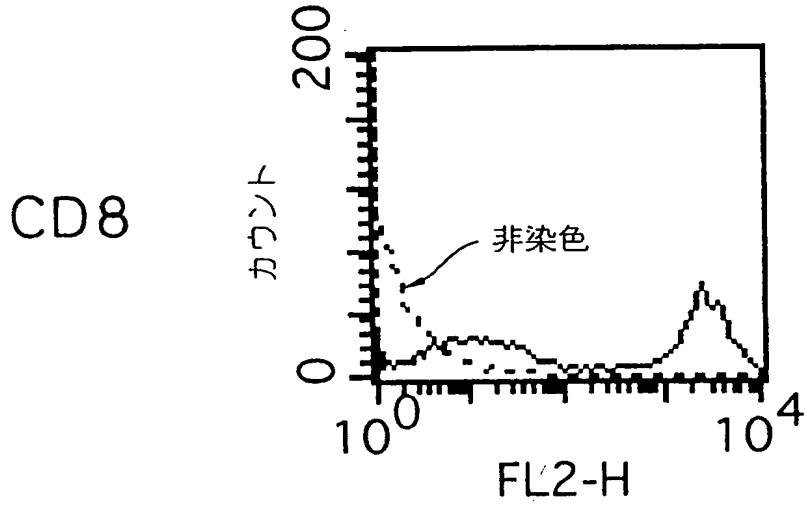
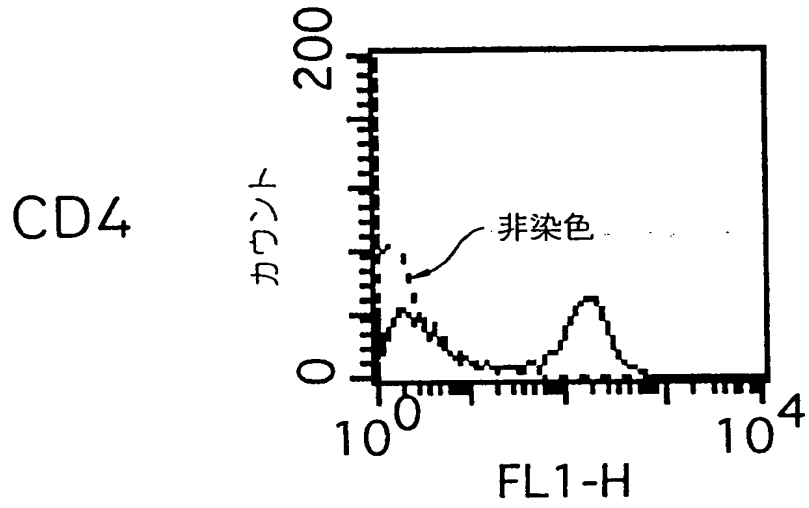


Fig.10

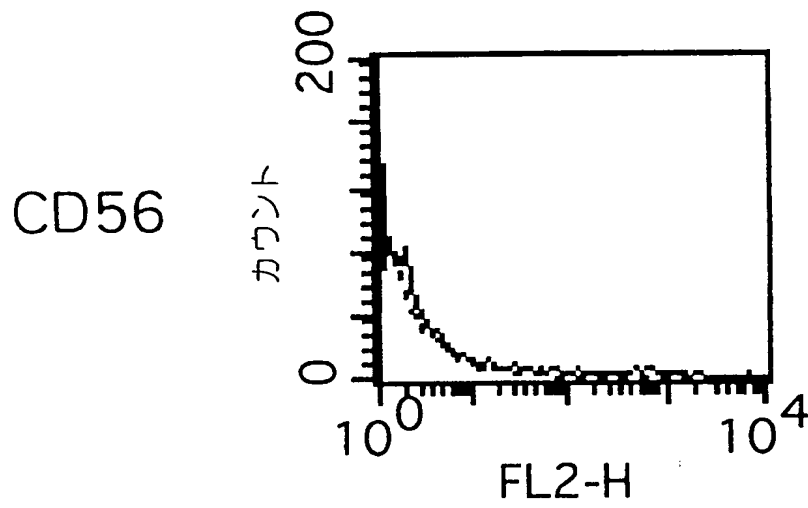


Fig.11

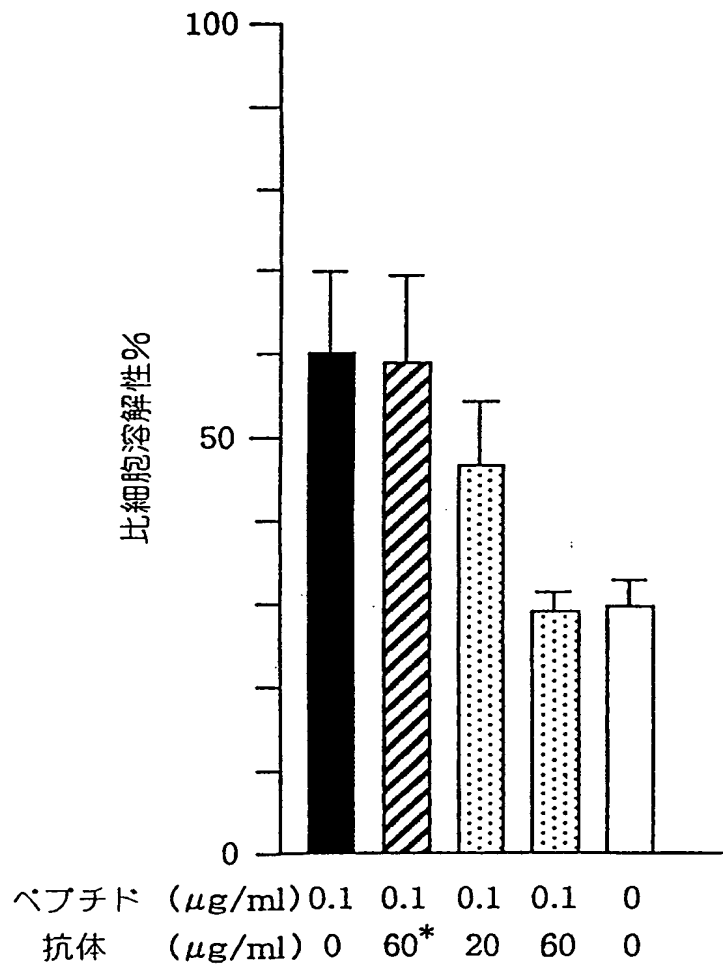


Fig.12

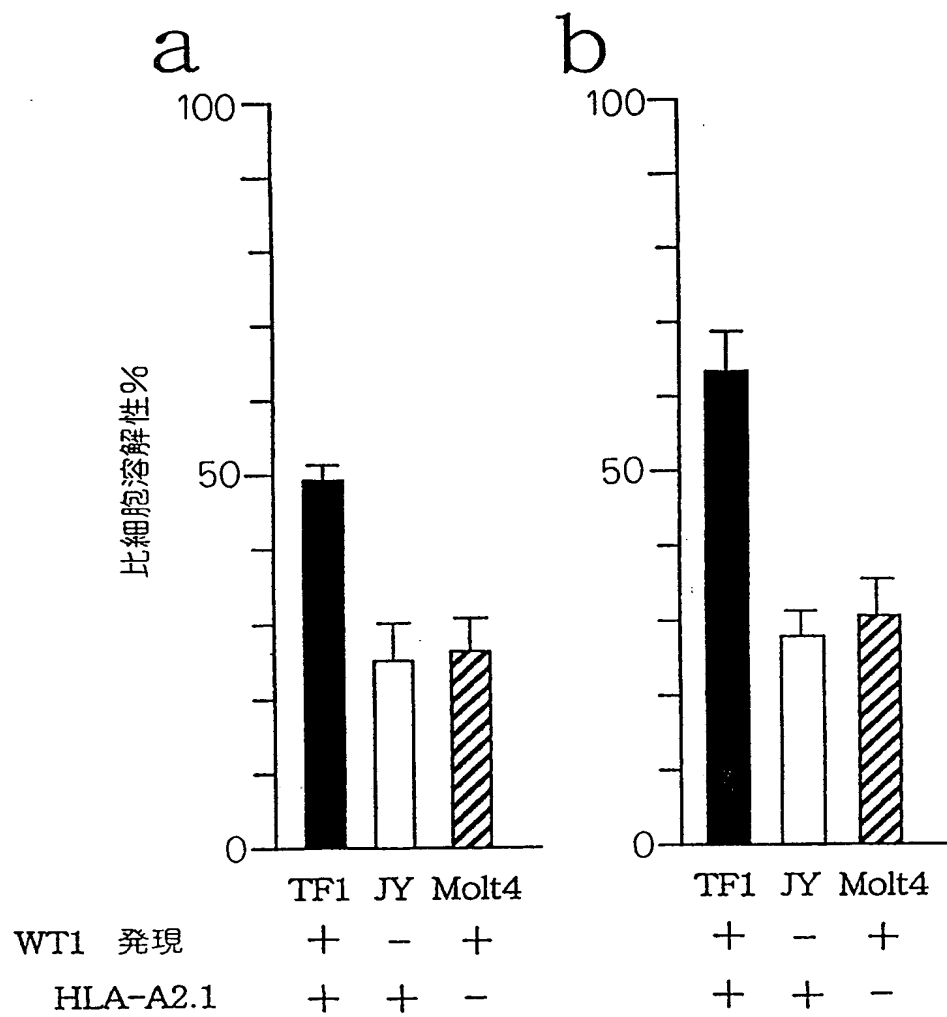


Fig.13

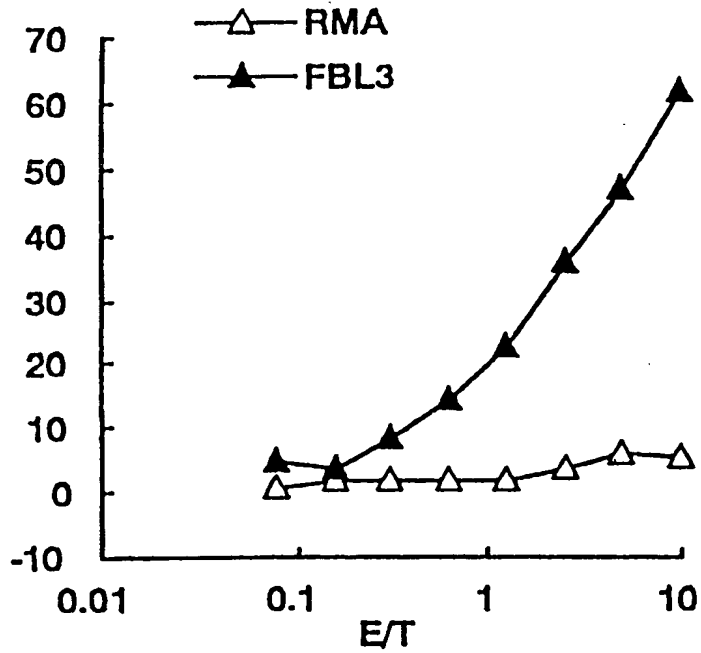


Fig.14

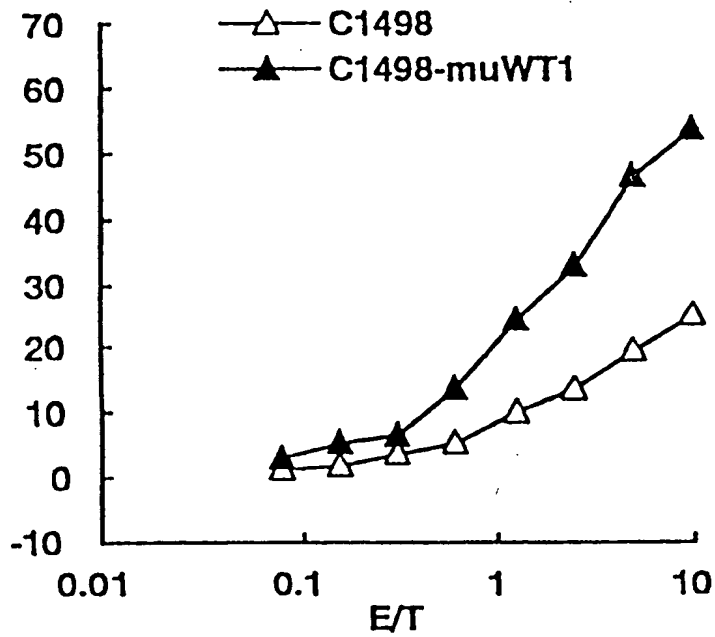


Fig.15

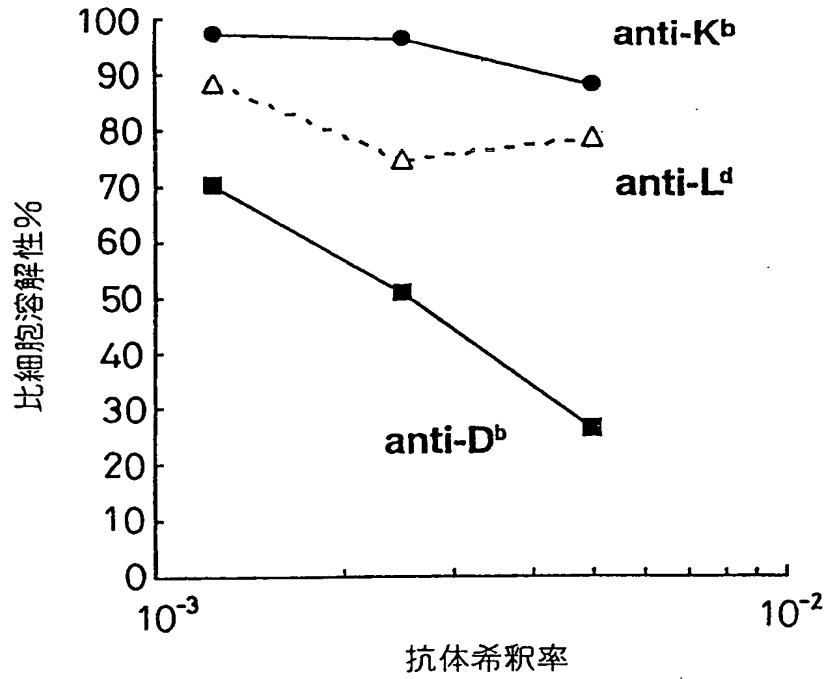
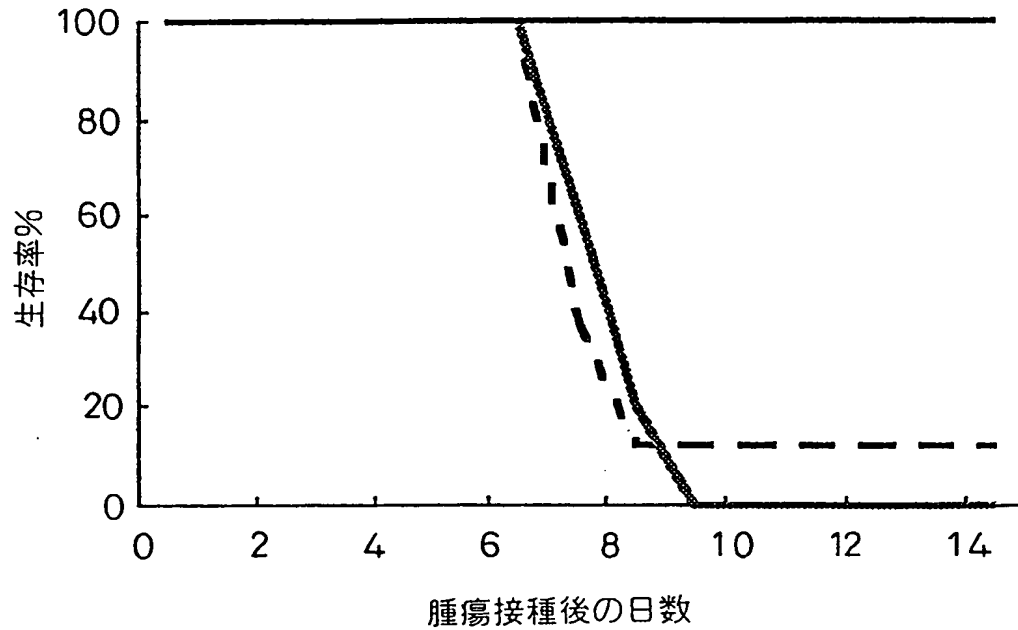


Fig.16



14/16

Fig.17

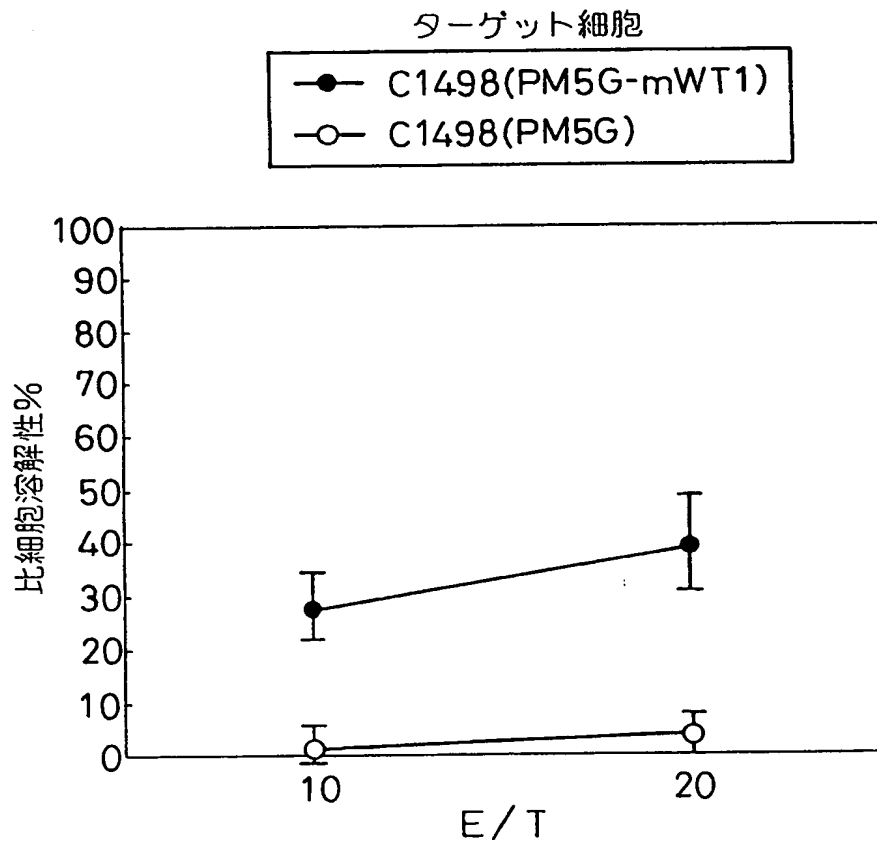
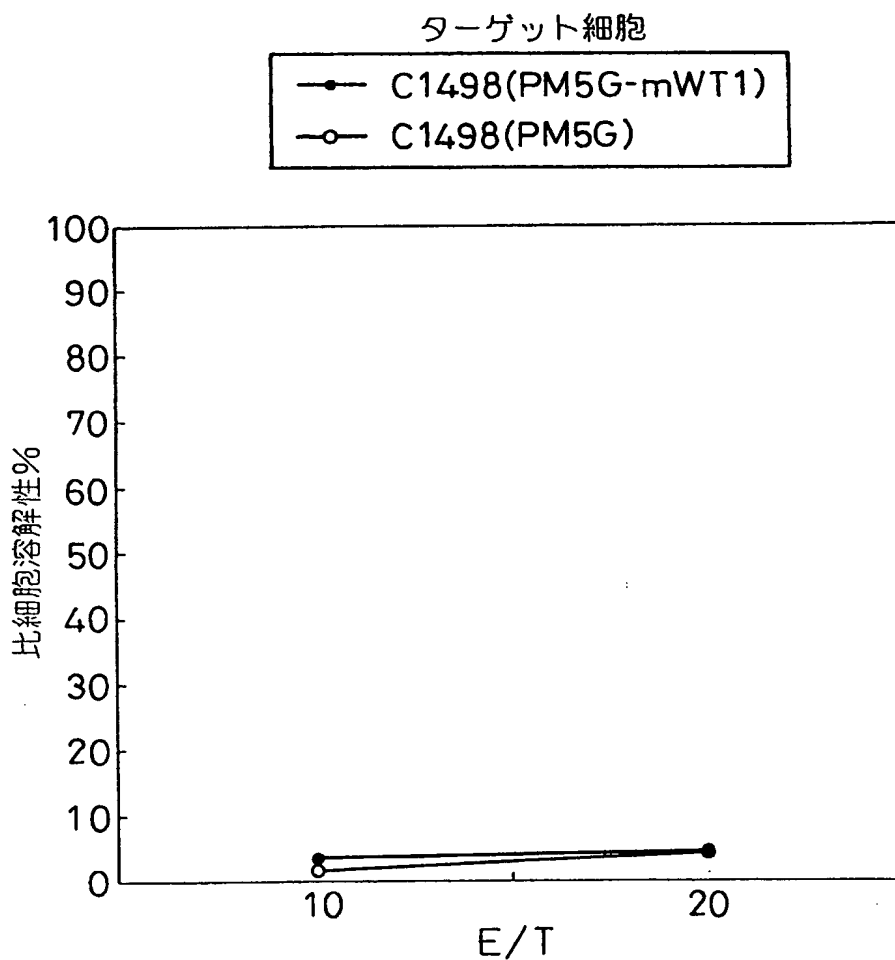


Fig.18



S E Q U E N C E L I S T I N G

< 1 1 0 >

< 1 2 0 > Cancer Antigen Based on Tumor Suppressor Gene WT1

< 1 3 0 > 9 8 3 2 7 9

< 1 6 0 > 8

< 2 1 0 > 1

< 2 1 1 > 4 4 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > M o u s e

< 4 0 0 > 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Ser

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro Val Ser Gly Ala

20

25

30

Arg Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala

35

40

45

Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro

50

55

60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly

65

70

75

80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Leu His Phe

85

90

95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe

100

105

110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe

115

120

125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Thr Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly Ile Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu His Val Ala
 435 440 445

Leu

449

- < 2 1 0 > 2
- < 2 1 1 > 4 4 9
- < 2 1 2 > P R T
- < 2 1 3 > H u m a n
- < 4 0 0 > 2

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 5 10 15
 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30
 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445
 Leu
 449
 < 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 8
< 2 1 2 > P R T
< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e
< 4 0 0 > 3

Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu

1 5

< 2 1 0 > 4
< 2 1 1 > 8
< 2 1 2 > P R T
< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e
< 4 0 0 > 4

Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu

1 5

< 2 1 0 > 5
< 2 1 1 > 9
< 2 1 2 > P R T
< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e
< 4 0 0 > 5

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 9
< 2 1 2 > P R T
< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e
< 4 0 0 > 6

Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met

1 5

< 2 1 0 > 7
< 2 1 1 > 9
< 2 1 2 > P R T
< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e
< 4 0 0 > 7

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5

< 2 1 0 > 8
< 2 1 1 > 9
< 2 1 2 > P R T
< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e
< 4 0 0 > 8

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/04130

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl⁶ C07K14/82, C07K7/00, C12N15/00, A61K39/00</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																	
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl⁶ C07K14/82, C07K7/00, C12N15/00, A61K39/00</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)</p>																	
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>Molecular and Cellular Biology, Vol. 11, No. 3 (1991) Alan J. Buckler, et al., "Isolation, Characterization, and Expression of the Murine Wilms' Tumor Gene (WT1) During Kidney Development", p.1707-1712</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP, 9-104629, A (Chuzo Kishimoto, Haruo Sugiyama), 22 April, 1997 (22. 04. 97), Full text ; Figs. 1 to 10 & WO, 9638176, A & EP, 841068, A & AU, 9657796, A</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Current Opinion in Immunology, Vol. 5, No. 5 (1993) Pardoll DM, "New strategie for enhancing the immunogenicity of tumors", p.719-725</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Current Opinion in Immunology, Vol. 5, No. 5 (1993) Melief CJ, et al., "Potential immunogenicity of oncogenea and tumor suppressor gene products.", p.709-713</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	Molecular and Cellular Biology, Vol. 11, No. 3 (1991) Alan J. Buckler, et al., "Isolation, Characterization, and Expression of the Murine Wilms' Tumor Gene (WT1) During Kidney Development", p.1707-1712	1-7	Y	JP, 9-104629, A (Chuzo Kishimoto, Haruo Sugiyama), 22 April, 1997 (22. 04. 97), Full text ; Figs. 1 to 10 & WO, 9638176, A & EP, 841068, A & AU, 9657796, A	1-6	Y	Current Opinion in Immunology, Vol. 5, No. 5 (1993) Pardoll DM, "New strategie for enhancing the immunogenicity of tumors", p.719-725	1-6	Y	Current Opinion in Immunology, Vol. 5, No. 5 (1993) Melief CJ, et al., "Potential immunogenicity of oncogenea and tumor suppressor gene products.", p.709-713	1-6
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
Y	Molecular and Cellular Biology, Vol. 11, No. 3 (1991) Alan J. Buckler, et al., "Isolation, Characterization, and Expression of the Murine Wilms' Tumor Gene (WT1) During Kidney Development", p.1707-1712	1-7															
Y	JP, 9-104629, A (Chuzo Kishimoto, Haruo Sugiyama), 22 April, 1997 (22. 04. 97), Full text ; Figs. 1 to 10 & WO, 9638176, A & EP, 841068, A & AU, 9657796, A	1-6															
Y	Current Opinion in Immunology, Vol. 5, No. 5 (1993) Pardoll DM, "New strategie for enhancing the immunogenicity of tumors", p.719-725	1-6															
Y	Current Opinion in Immunology, Vol. 5, No. 5 (1993) Melief CJ, et al., "Potential immunogenicity of oncogenea and tumor suppressor gene products.", p.709-713	1-6															
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																	
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>															
<p>Date of the actual completion of the international search 14 October, 1999 (14. 10. 99)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 2 November, 1999 (02. 11. 99)</p>															
<p>Name and mailing address of the ISA Japanese Patent Office</p> <p>Facsimile No.</p>		<p>Authorized officer</p> <p>Telephone No.</p>															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04130

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Immunogenetics, Vol. 41, No. 4 (1995) Rammensee HG, et al., "MHC ligands and peptide motifs: first listing.", p.178-228	1-6
PY	Proceeding of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, Vo. 40 (March, 1999) Gaiger A, et al., "WT1: A new leukemia and cancer antigen.", p.424	7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C07K14/82, C07K7/00, C12N15/00, A61K39/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C07K14/82, C07K7/00, C12N15/00, A61K39/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Molecular and Cellular Biology, 第11巻, 第3号. (1991) Alan J. Buckler, et. al. 「Isolation, Characterization, and Expression of the Murine Wilms' Tumor Gene (WT1) During Kidney Development」, p. 1707-1712	1-7
Y	J P, 9-104629, A (岸本忠三、杉山治夫) 22. 4月. 1997 (22. 04. 97) 全文, 第1-10図 & WO, 9638176, A & EP, 841068, A & AU, 9657796, A	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	14. 10. 99	国際調査報告の発送日 02.11.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 齊藤 真由美	4 N 9839
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Current Opinion in Immunology, 第5巻, 第5号. (1993) Pardoll DM, 「New strategie for enhancing the immunogenicity of tumors」, p. 719-725	1 - 6
Y	Current Opinion in Immunology, 第5巻, 第5号. (1993) Melief CJ, et. al., 「Potential immunogenicity of oncogenea an d tumor suppressor gene products.」, p. 709-713	1 - 6
Y	Immunogenetics, 第41巻, 第4号. (1995) Rammensee HG, et. al., 「MHC ligands and peptide motifs: first listing.」, p. 178-228	1 - 6
P Y	Proceeding of the American Associaion for Cancer Research Annual Meeting, 第40巻 (3月. 1999) Gaiger A, et. al., 「WT1:A new leukemia and cancer antigen.」, p. 424	7

1

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

INTERNATIONAL BUREAU

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT
COOPERATION TREATY

<p>(51) Int. Pat. Cl.⁶ C07 14/82, 7/00, C12N 15/00, A61K 39/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Published No. WO00/06602 (43) Publication Date 10 February 2000</p>
<p>(21) International Application No. PCT/JP99/4130 (22) Filing Date 30 July 1999 (30.7.99) (30) Priority Data Application 10/218093 31 July 1998 JP (71) Applicant, and (72) Inventor H. Sugiyama 2-19-30 Funaba-nishi, Minoo-shi, Osaka-fu 562-0036 (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (USA only) Y. Oka 3-4-42-202 Takao-dai, Tondabayashi-shi, Osaka-fu 584-0072 (74) Agents T. Ishida <i>et al.</i> Aowa Patent Law Business, Mori Bdg. 37 Toranomom, 3-5-1 Toranomom, Minato-ku, Tokyo-to 105-8423</p>		<p>(81) Designated States Additional documents international search report</p>
<p>(54) Title: CANCER ANTIGENS BASED ON PRODUCTS OF TUMOUR GENE <i>WT1</i></p>		

2

SPECIFICATION

Cancer antigens based on products of tumour suppressor gene *WT1*

Technical Field

The present invention relates to cancer antigens based on products of the Wilms' tumour suppressor gene *WT1*. These cancer antigens are useful as cancer vaccines against leukaemia, myelodysplastic syndromes, multiple myeloma and malignant lymphoma and other cancers of the blood, or solid cancers such as stomach cancers, bowel cancers, lung cancers, mammary gland cancers, germ cell cancers, liver cancers, skin cancers, bladder cancers, prostate cancers, uterine cancers, cervical cancers and ovarian cancers for example, as well as all cancers which express *WT1*.

Background Art

The immune mechanisms for eliminating foreign substances are commonly classified into humoral immunity, due to macrophages which recognise antigens and function as antigen presenting cells, helper T lymphocytes which recognise antigens presented by said macrophages and activate T other lymphocytes etc., by producing lymphokines, and B lymphocytes which differentiate into antibody-producing cells under the action of said lymphokines, and cellular immunity, in which killer T lymphocytes which have differentiated on being with presented with an antigen then attack and destroy the target cells.

At the present moment in time, immunity to cancer is thought to be principally due to cellular immunity mediated by killer T cells. In cancer immunity due to killer T cells, precursor T cells recognise a cancer antigen presented in the form of a complex between the cancer antigen and the major histocompatibility complex (MHC) class I and differentiate and proliferate to produce killer T cells

3

which attack and destroy the cancer cells. In this process, the MHC class 1 antigen-cancer antigen complex is presented on the cell surface, and this is the target for the killer T cells (*Curr. Opin. Immunol.*, **5**, 709 (1993); *Curr. Opin. Immunol.*, **5**, 719 (1993); *Cell* **82**, 13 (1995), *Immunol. Rev.* **146**, 167 (1995)).

The aforementioned cancer antigens presented by MHC class I antigens on cancer cells are thought to be peptides comprising approximately 8-12 amino acids produced as a result of intracellular protease processing of antigen protein synthesised in the cancer cells (*Curr. Opin. Immunol.* **5**, 709 (1993); *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 719 (1993); *Cell* **82**, 13 (1995); *Immunol. Rev.* **146**, 167 (1995)).

Currently, various cancers have been screened for antigen protein, but few cancer-specific antigens have been demonstrated.

The Wilms' tumour suppressor gene *WT1* (gene *WT1*) was isolated from chromosome 11 p13 and identified as a gene causing Wilms' tumour as the result of analysis of WAGR syndromes complicated by Wilms' tumour, aniridia, genitourinary abnormalities and retarded neurotransmission, etc., (Gessler, M., *et al. Nature* Vol. 343 p. 774-778 (1990); the genomic DNA comprises 10 exons of approximately 50 kb, and its cDNA is of approximately 3 kb. The amino acid sequence deduced from the cDNA is shown in SEQ ID NO: 1 (*Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1707 (1991)).

Gene *WT1* is highly expressed in human leukaemia and proliferation of leukaemia cells is suppressed when the cells are treated with *WT1* antisense oligomers (Japanese Laid-Open Patent 104627/1997), indicating that gene *WT1* acts to promote the proliferation of leukaemia cells. Moreover, gene *WT1* is also highly expressed in stomach cancer, bowel cancer, lung cancer, breast cancer, germ cell cancer, liver cancer, skin cancer, bladder cancer prostate cancer, uterine cancer, cervical cancer and ovarian cancer and other solid cancers (Japanese Patent Application 191635/1997), confirming that gene *WT1* is a new

4

tumour marker in leukaemia and solid cancers. However, it has not been demonstrated that products of *WT1* gene expression are useful cancer-specific antigens for anticancer vaccines.

Disclosure of the Invention

Therefore, the object of the present invention is to confirm that products of gene *WT1* expression are possible cancer antigens, and to offer novel cancer antigens.

As the result of studies designed to solve the problem above, the present inventors have synthesised peptides of 7-30 consecutive amino acids within the amino acid sequence of products of expression of gene *WT1*, including at least 1 amino acid predicted to function as an anchor amino acid in binding with murine and human MHC class I and MHC class II, and have confirmed that these peptides bind with MHC class I proteins; and have also confirmed that binding with an MHC class I antigen induces killer T cells, and leads to an advantageous cytotoxic effect on target cells, thereby perfecting the present invention.

Therefore, the present invention offers cancer antigens which include a product of expression of the murine *WT1* gene or a portion thereof. In a preferred form, the present invention offers cancer antigens in which the active ingredient is a peptide comprising 6-30 amino acids within the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 corresponding to *WT1* cDNA, including an anchor amino acid for binding with MHC class I antigens.

Moreover, the present invention also offers cancer antigens in which the active ingredient in a peptide comprising 7-30 amino acids in the amino acid sequence shown in SEQ. ID NO: 2 corresponding to human *WT1* cDNA, including an anchor amino acid for binding with MHC antigens.

The present invention also offers cancer vaccines which include a cancer

5

antigen above..

Simplified Explanation of the Drawings

Figure 1 is a graph showing the proportions of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells in flow cytometry of cells immunised with D^b126 and non-immunised cells in Example 1.

Figure 2 is a graph comparing the cytotoxic effect on target cells immunised with peptide D^b 126 when pulsed with peptide D^b 126 and when not pulsed in Example 2.

Figure 3 is a graph with the same significance as Figure 2.

In Figure 4, A is a graph showing the results of the cytotoxic effect of CTL induced by using peptide D^b 126 in T2 cells pulsed with peptide D^b 126 in Example 3, and B is a graph showing the results of the cytotoxic effect of CTL induced by WH 187 peptide in T2 cells pulsed with WH 187 peptide in Example 3.

Fig. 5 is a chart showing the results of FACS analysis of CTL surface markers induced by peptide D^b 126 (CD19 cells and CD3 cells).

Fig. 6 is a chart similar to Figure 5 for CD4 cells and CD8 cells.

Fig. 7 is a chart similar to Figure 5 for CD56 cells.

Fig. 8 is a chart showing the results of FACS analysis of CTL surface markers induced by WH 187 peptide (CD19 cells and CD3 cells).

Fig. 9 is a chart similar to Figure 8 for CD4 cells and CD8 cells.

Fig. 10 is a chart similar to Figure 8 for CD56 cells.

Fig. 11 is a graph showing the effect of anti-HLA-A2.1 antibodies on specific cytolysis due to D^b 126 peptide-specific CTL in T2 cells pulsed with peptide D^b

6

126.

Figure 12 is a graph comparing the cytolytic activity of D^b 126 peptide-specific CTL on target cells expressing *WT1* and target cells not expressing *WT1*. a shows the results when the E:T ratio was 7.5:1, and b shows the results when the E:T ratio was 15:1.

Figure 13 is a graph comparing the cytolytic activity of D^b 126 peptide-specific CTL on tumour cells which inherently express *WT1* (FBL3) and tumour cells which do not express *WT1* (RMA).

Figure 14 is a graph comparing the cytolytic effect of D^b 126 peptide-specific CTL against cells transformed with gene *WT1*, and non-transformed cells.

Figure 15 is a graph showing the effect of anti-H2 class I antibodies on the cytotoxicity of D^b 126 peptide-specific CTL.

Figure 16 is a graph showing the *in vivo* immune effect in mice immunised using peptide D^b 126 as a vaccine.

Figure 17 is a graph showing the *in vivo* immune effect in mice immunised using a plasmid expressing *WT1* as a DNA vaccine.

Figure 18 is a graph showing that no immune effect was produced by administering a plasmid did not express *WT1* in the control for Figure 17.

The Preferred Mode for Carrying Out the Invention

In the present invention, selection of peptides expected to be selective for murine MHC class I K^b or D^b and human HLA A*0201 and to have high affinity with these was fundamental in designing the cancer antigen peptides.

From *Immunogenetics* Vol. 41, pp. 178-228 (1995), Phe and Tyr at 5 and Leu and Met at 8 were expected to be among the anchor amino acids for binding to K^b, and Asn-5 and Met and Ile at 9 were expected to be among the anchor

7

amino acids for binding to D^b.

In addition, the size of cancer antigen peptides presented by MHC class I is known to be about 8-12 amino acids, and therefore the cancer antigen peptides of the present invention are peptides comprising 7-30 consecutive amino acids in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:1 produced by gene *WT1*, including an anchor amino acid. The number of amino acids is preferably 8-12 – 8 to 9, for example..

In the present invention, the peptides of 8 amino acids below were used as specific examples of peptides binding to MHC class I K^b:

K^b 45 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (SEQ ID NO: 3)

K^b 330 Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (SEQ ID NO: 4)

and the peptides of 9 amino acids below were used as peptides binding to MHC class I D^b:

D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 5)

D^b 221 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (SEQ ID NO: 6)

D^b 235 Cys Met The Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 7).

The amino acids underlined in the sequences above are the amino acids predicted to function as anchor amino acids.

The ability of these peptides K^b 45 and K^b 330 to bind with MHC class I K^b and the ability of peptides D^b126, D^b 221 and D^b 235 to bind with MHC class I D^b were determined using a cell line which expresses K^b and D^b (RMA-S) without antigen markers (empty).

Thus, MHC class I was highly expressed by culturing RMA-S at 26° C, and then the cultured cells were incubated for 1 hour at 37°C with solutions of the test peptides. As a result MHC molecules not bound to a peptide became

8

unstable and were lost from the cell surface, leaving only peptide-bound MHC class 1 molecules. The RMA-S cells were then stained with fluorescently labelled monoclonal antibodies which recognised MHC class I (K^b or D^b). Finally, binding dissociation constants were calculated from the average quantity of fluorescence per cell, found by FACS assay (*Immunol Lett.* 47, 1 (1995)).

The results obtained were as follows.

K^b 45 -4.5784838 (log)

K^b 330 5.7617732

D^b 126 -6.2834968

D^b 221 -5.7545398

D^b 235 -6.1457624

From results above, that all of the peptides showed strong to moderate binding affinity (kd value) for K^b or D^b; however, the peptide which showed the highest affinity, D^b 126, was used in subsequent experiments.

From *Immunogenetics* Vol. 41, pp.178-228 (1995), it was predicted that in man the anchor amino acids for binding to HLA-A* 0201 would be Leu and Met 2 from the N-terminus and Val and Leu 9 from the N terminus. Accordingly, two peptides comprising 9 amino acids from within the amino acid sequence for human WT1 protein (*Mol. Cell. Biol.* Vol., 11, pp. 1707-1712 (1991)) (SEQ ID NO: 2) were synthesised which met the conditions above.

D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 5)

(The same as the sequence of D^b 126 in the mouse)

WH 187 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 8)

(The underlining indicates the anchor amino acids.)

The peptides above were tested for their ability to bind with HLA-A* 0201 by

9

the following method.

The peptides above were incubated at 37° C for 1 hours with empty T2 cells having HLA-A*0201 (*J. Immunol.*, 150, 1763 (1993); *Blood* 88, 2450 (1996)), and then the T2 cells were stained with fluorescently labelled monoclonal antibodies which recognised HLA-A2.1, and the binding dissociation constant was calculated from the average fluorescence per cell determined by FACS.

Binding capacity

Peptide	Kd (M)
D ^b 126	1.89 x 10 ⁻⁵
WH 187	7.61 x 10 ⁻⁶

Both peptides showed at least moderate binding affinity.

The experiments below were performed using Db 126 and WH 187 as peptides corresponding to the human MHC.

The present invention also relates to cancer vaccines in which the active ingredient is an aforementioned antigen. These vaccines can be used to prevent or treat cancers, including leukaemia, myelodysplastic syndromes, multiple myeloma and malignant lymphoma and other cancers of the blood, or stomach cancer, bowel cancer, lung cancer, breast cancer, germ cell cancer, liver cancer, skin cancer, bladder cancer, prostate cancer, uterine cancer, cervical cancer, ovarian cancer and other solid cancers, for example, by raising the level of expression of gene *WT1*. These vaccines can be administered orally or non-orally – for example by intraperitoneal administration, subcutaneous administration, intradermal administration, intramuscular administration, intravenous administration intranasal administration or by some other route.

An alternative method for administering vaccines of the present invention is to collect peripheral blood from the patient, removing the dendritic cells, pulsing

10

them with a peptide of the present invention and returning them to the patient by the subcutaneous route or some other route.

In addition to the peptide administered as the aforementioned active ingredient, the vaccine can also include a pharmaceutically permitted carrier, for example a suitable adjuvant, for example a mineral gel such aluminium hydroxide, a surfactant such as lysolecithin or a pluronic polyol, a polyanion, peptide or oil emulsion aid. Or it can be mixed into liposomes, include a polysaccharide and/or other aggregate included in vaccines. The dose will generally be 0.1 μg to 1 mg/kg per day.

The present invention can also be used as a vaccine of DNA coding a polypeptide vaccine above (DNA vaccine). Thus, a nucleic acid, and preferably DNA, coding *WT1* or a part thereof can be inserted into a suitable vector, and preferably an expression vector and then administered to an animal to produce cancer immunity. A concrete example is presented in Example 9.

Examples

Next, the peptides of the present invention will be shown to be useful as cancer antigens and cancer vaccines by means of practical examples.

Example 1

C57BL/6 mice were immunised twice weekly by intraperitoneal injection of 100 μg of peptide D^b 126, 200 μg of porcine lactate dehydrogenase (LDH) and 0.5 ml of Freund's incomplete adjuvant. One week after immunisation, the spleens were removed from the mice to prepare a splenocyte suspension. Meanwhile, irradiated splenocytes from mice of the same strain pulsed with peptide D^b 126 were incubated for 30 minutes at 37°C with a solution containing the peptide at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The aforementioned immunised splenocytes and irradiated splenocytes were

11

mixed and cultured together for 5 days to induce killer T cells. A killing assay was performed using the conventional method with europium-labelled EL-4 cells (expressing K^b and D^b) pulsed with peptide D^b 126 (incubated for 30 minutes at 37°C with a solution of peptide at 100 µg/ml) as target cells, by the following procedure (Table 1).

As a result, there was a cytotoxic effect with D^b 126-pulsed EL-4 target cells, but hardly any cytotoxic effect was seen in EL-4 cells that had not been pulsed with D^b 126.

Table 1

	Mouse A	Mouse B
Peptide +	76.6%	37.2%
Peptide -	4.9%	0.9%

E/T 40:1

Next the expression of CD4 and CD8 in splenocytes which showed a significant cytotoxic effect in the killing assay was analysed by flow cytometry after staining with fluorescently-labelled anti-CD4 antibodies or anti-CD8 antibodies.

The results, in Figure 1, showed an increase in CD8⁺ cells, typically killer T cells, in splenocytes immunised with peptide D^b 126 compared with non-immunised irradiated cells, with the increase reversing the proportion of CD8⁺ cells relative to CD4⁺ cells, typically helper T cells.

Example 2

Dendritic cells (DC) were prepared as follows from the bone marrow of C57BL/6 mice. Myelocytes were cultured by the usual method in the presence of GM-CSF, to prepare bone marrow dendritic cells (*J. Exp. Med.* **182**, 255 (1995)).

Seven-day cultured dendritic cells were incubated for 3 hours with OVAII (Ovalbumin II) at 10 µM and peptide D^b 126 at 1 µM, and then washed.

12

The DC cells above were injected into the skin of the foot pads and hands of C57BL/6 mice; on day 5, the associated lymph nodes were removed and a cell suspension was prepared. Meanwhile, B7.1-RMA-S cells pulsed with peptide D^b 126 and irradiated (RMA-S cells transfected with the gene coding the co-stimulatory molecule B7.1) were prepared.

The above lymph node cell suspension and B7.1-RMA-S cells were then mixed and restimulated by culturing *in vitro*.

Then, on day 5 of *in vitro* restimulation a killing assay was performed, targeting ⁹¹Cr-labelled RMA-S cells. Use of 1/8 of all the lymphocytes recovered on day 5 of restimulation as effector cells gave the maximum E/T ratio (1.0).

As shown in Figure 2 and Figure 3, effector cells from lymph nodes of mice immunised with peptide D^b 126 killed target cells pulsed with said peptide, whereas cells that were not pulsed with said peptide were not killed.

In addition, when the ratio of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells was analysed by flow cytometry as in Example 1, CD4 : CD8 = 1 : 1.4-1.7 with an increase in CD8⁺ cells among cells from mice immunised with peptide D^b 126 compared with non-immunised mice (control) (in control cells the ratio was approximately 2:1), with the ratio of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells being reversed among immunised cells.

Example 3

5 x 10⁴ T2 cells irradiated after incubation for 1 hour with peptide D^b 126 or WH 187 (40 µg/ml) and 1 x 10⁶ healthy human peripheral monocytes having HLA-A* 0201 were cultured together. After 1 week, T2 cells irradiated after incubation for 1 hour with the peptide (20 µg/ml) were added to the above joint culture, and restimulated. From the following day human IL-2 was added to the culture solution (final solution 100 JRU/ml).

Stimulation with T2 cells irradiated after pulsing with the peptide was

13

repeated 5 more times, and then killing assays were performed with T2-cells pulsed with the peptide or un-pulsed T2-cells as the target. Induction of CTL surface markers was also analysed by FACS.

The killing assay was performed by the usual method, with europium-labelled T2-cells pulsed with peptide used as the target.

Effector : target ratio (E/T ratio) was 10:1; joint culture time was 3 hours.

Peptide concentration in the culture solution : 5 μ g/ml

The results are shown in Figure 4. Figure 4 A shows the cytotoxic effect of CTL induced using peptide D^b 126 on T2-cells pulsed with peptide D^b 126; and Figure 4 B shows the cytotoxic effect of CTL induced using peptide WH 187 on T2-cells pulsed with peptide WT 187.

In both cases a more intense cytotoxic effect was seen in T2-cells pulsed with peptide.

The results of FACS analysis are shown in Figure 5 to Figure 10. Figures 5-7 show the results for human CTL induced by peptide D^b 126; nearly all cells were CD8⁺. Figures 8-10 show the results for human CTL induced by peptide WH 187. There were approximately equal numbers of CD4⁺ and CD8⁺ cells.

Example 4

In order to test MHC-restriction of the cytolytic activity of D^b 126 peptide-specific CTL, anti-HLA-A2.1 monoclonal antibodies were used in order to block the cytotoxic activity of CTL against T2 cells pulsed with the peptide. The dependence or non-dependence of specific cytolysis of T2-cells pulsed with peptide D^b 126 on blocking monoclonal antibodies (BB7.2) to the HLA2.1 molecule was determined at an E/T ratio of 5:1.

The results are shown in Figure 11, In this graph, * shows the results when an anti-H-2K^b monoclonal antibody was used instead of the anti-HLA-A2.1

monoclonal antibody. It is clear from the graph that cytotoxicity is lowered to the background level of T2-cell cytolysis by the addition of the anti-HLA-A2.1 antibody at 60 µg/ml. T2 cell lysis was not affected by an unrelated monoclonal antibody of the same isotype (anti-H-2K^b monoclonal antibody Y3).

Example 5

D^b 126 peptide-specific CTL were tested for ability to kill HLA-A2.1-positive leukocytes which inherently express *WT1*. Cytotoxicity was determined using TF1 cells (expressing *WT1*; HLA-A2.1-positive), JY cells (not expressing *WT1*; HLA-A2.1-positive) and Molt-4 cells (expressing *WT1*; HLA-A2.1-negative) were used as target cells, at an E/T ratios 7.5:1 or 15:1.

The results are shown in Fig. 12. D^b 126 peptide-specific CTL showed significant cytotoxicity towards TF1 cells, which express *WT1* and are HLA-A2.1-positive, but showed no more than a background level of cytolysis in the case of Molt-4 (expressing *WT1*; HLA-A2.1-negative) and JY cells (not expressing *WT1*; HLA-A2.1-positive)

Example 6

D^b 126 peptide-specific CTL were tested for ability to recognise and cause cytolysis of tumour cells which inherently express *WT1*. Specific cytolysis was determined at the E/T ratios shown in Figures 13 and 14 in tumour cells which express *WT1* (FBL3) and tumour cells which do not express *WT1* (RMA) (Figure 13), and in C1498 cells transfected with the *WT1* gene and C1498 cells not transfected with the *WT1* gene (Figure 14).

As shown in Figure 13, D^b 126 peptide-specific CTL caused lysis in FBL3 cells, which inherently express *WT1*, but did not cause lysis in RMA cells, which do not express *WT1*. Moreover, as shown in Figure 14, D^b 126-peptide specific CTL killed C1498 cells transfected with the murine *WT1* gene rather than the parent C1498 cells, which do not express *WT1*. This confirmed definitively that

15

the molecule targeted by the CTL in killing cells is a *WT1* peptide. These results indicate that D^b 126 peptide-specific CTL can recognise peptide D^b 126 or an associated peptide produced naturally by intracellular processing of *WT1* protein and present on the H-2 D^b molecule of cells expressing *WT1*.

Example 7

In order to test MHC restriction of the cytolytic activity of the CTL, determinations were performed in the presence of H-2 class I molecules. Thus, [cytolysis of]¹ RMA-S cells pulsed with peptide D^b 126 by D^b 126 peptide-specific CTL was tested in the presence of controlled titres of monoclonal antibodies to H-2 K^b (28.13.3S), H-2 D^b (28.11.5S) or H-2 L^d (MA143). As control monoclonal antibodies, monoclonal antibodies of the corresponding isotype were used.

The results are shown in Figure 15. CTL cytolytic activity towards RMA-S cells pulsed with peptide D^b 126 was suppressed in a concentration-dependent manner by antibodies to H-2 D^b, but antibodies against H-2 K^b or H-2 L^d did not suppress CTL cytolytic activity. These results indicate that the CTL show H-2 D^b-restricted cytolytic activity.

Example 8

Peptide D^b 126 was tested for the ability to provoke tumour immunity *in vivo* by positive immunisation. Mice were immunised once in 1 week with LPS-activated splenocytes pulsed with peptide D^b 126 (solid line in Figure 16), LPS-activated splenocytes alone (crosshatched line) or phosphate-buffered saline (PBS) (broken line). Three weeks after immunisation, they were challenged by intraperitoneal injection of 3×10^7 FBL3 leukaemia cells.

The results are shown in Figure 16. Mouse immunised with peptide D^b 126

¹ The words "cytolysis of" are not in the Japanese, but seem to be needed to make sense of the sentence. Translator

16

overcame the tumour challenge and survived, but non-immunised mice and mice immunised with LPS-activated splenocytes did not withstand the tumour challenge, and died. Ascites was seen within 3 days of the aforementioned inoculation of tumour cells into the peritoneum in both immunised and non-immunised mice. In the non-immunised mice the ascites continued to increase, and the mice died. In the immunised mice, on the other hand, there was a subsequent gradual diminution of ascites and the mice completely rejected the tumour challenge and survived. Natural regression was seen in isolated cases among non-immunised mice. This regression is thought to be due to the natural induction of CTL specific for Friend leukaemia virus (FBL3 leukaemia cells are transformed by this virus). This type of CTL induction is sometimes observed in C57BL/6 mice.

Embodiment 9 DNA vaccine

6-8-week old C57BL/6 mice were given a total of 3 intramuscular injections of 100 µg of plasmid DNA expressing *WT1* (a plasmid persistently expressing *WT1*, constructed by ligating the Sun 3A1 fragment of murine *WT1* cDNA (*Molecular and Cellular Biology* Vol. 11, No. 3, pp. 1707-1712 (1991; p. 1709, left column) with a CMV-IE promotor) (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **92**, 11105-11109 (1995)) at 10-day intervals. Ten days after the last injection, the spleens of the mice were removed, to give a splenocyte preparation; these splenocytes were cultured with mWT1 C1498 cells expressing *WT1* (irradiated with 40 Gy) for 6 hours at 37°C, and then a killing assay (europium labelling) was performed using as target cells C1498 expressing *WT1* (PM5G-m*WT1*) and C1498 not expressing *WT1* (PM5G). C1498 is a murine bone marrow leukaemia cell line which does not express *WT1*.

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) were induced which killed C1498 cells expressing *WT1* (PM5G-m*WT1*) but did not kill cells that did not express *WT1*.

17

The results are shown in Figure 17.

As a control, the experiment above was repeated, but a plasmid that did not express *WT1* (without *WT1* cDNA) was injected intramuscularly into mice instead of instead of the plasmid expressing *WT1*. Splenocytes were taken as in the experiment above, and a killing assay was carried out after *in vitro* stimulation with C1498 expressing *WT1* (PM5G-m*WT1*).

As shown in Figure 18, *WT1* protein-specific CTL were not induced after intramuscular injection of the control plasmid DNA which did not include *WT1* cDNA.

The results above demonstrate definitively that the peptides of the present invention function as cancer antigens and that they cause the induction an proliferation of killer T cells (T cells which harm cancer cells). Therefore, cancer antigen peptides of the present invention raise the expression of the *WT1* gene and are useful as a cancer vaccine against solid carcinomas.

CLAIMS

1. A cancer antigen in which a product of cancer suppressor gene *WT1* or a partial peptide thereof is an active ingredient.

2. A cancer antigen as described in Claim 1, in which the active ingredient is a peptide comprising 7-30 consecutive amino acids in SEQ ID NO: 1, including an anchor amino acid needed for binding to an MHC molecule, or a peptide comprising 7-30 consecutive amino acids in SEQ ID NO: 2, including an anchor amino acid needed for binding to a n MHC molecule.

3. A cancer antigen as described in Claim 1 or 2, in which the aforementioned antigen is an antigen for cancer which causes high expression of the cancer suppressor gene *WT1*.

4. A cancer antigen as described in Claim 1 or 2 in which the aforementioned cancer is leukaemia, a myelodysplastic syndrome, malignant lymphoma, multiple myeloma, stomach cancer, bowel cancer, lung cancer, breast cancer, germ cell cancer, liver cancer, skin cancer, bladder cancer, uterine cancer, cervical cancer or ovarian cancer.

5. A cancer antigen as described in any of Claims 1-4 in which the aforementioned peptide is any of:

K^b 45 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (SEQ ID NO: 3)

K^b 330 Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (SEQ ID NO: 4).

D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 5)

D^b 221 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (SEQ ID NO: 6)

D^b 235 Cys Met The Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 7)

WH 187 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 8)

19

6. A cancer antigen as described in Claim 5 in which the aforementioned peptide is:

D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 5), or

WH 187 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 8).

7. A cancer vaccine including a cancer antigen described in any of Claims 1-6.

20

Fig. 1

Immunised with D ^b 126 peptide	(Unstained)	Non-immunised
[y-axis] Count		[y-axis] Count
	(CD4)	
[y-axis] Count		[y-axis] Count
	(CD8)	
[y-axis] Count		[y-axis] Count

Fig. 2

	Mouse 1	
[y-axis] Cytolysis (%)		Peptide D ^b 126
[x-axis] E/T		No peptide
	Mouse 2	
[y-axis] Cytolysis (%)		Peptide D ^b 126
[x-axis] E/T		No peptide

Fig. 3

	Mouse 3	
[y-axis] Cytolysis (%)		Peptide D ^b 126
[x-axis] E/T		No peptide
	Mouse 4	
[y-axis] Cytolysis (%)		Peptide D ^b 126
[x-axis] E/T		No peptide

Fig. 4

21

[y-axis] Cytolysis (%)

Peptide

Fig. 5

[y-axis] Count

[y-axis] Count

Non-stained

Fig. 6

[y-axis] Count

[y-axis] Count

Non-stained

Fig. 7

[y-axis] Count

Fig. 8

[y-axis] Count

[y-axis] Count

Non-stained

Fig. 9

[y-axis] Count

[y-axis] Count

Non-stained

Non-stained

Fig. 10

[y-axis] Count

Fig. 11

[y-axis] Cytolysis (%)

[x-axis] Peptide

Antibody

[y-axis] Cytolysis (%)

Peptide

22

Fig. 12

[y-axis] Cytolysis (%)

[x-axis] WT1 expression

Fig. 13

Fig. 14

Fig. 15

[y-axis] Cytolysis (%)

[x-axis] Antibody dilution rate

Fig. 16

[y-axis] Survival rate (%)

[x-axis] Days after tumour inoculation

Fig. 17

Target cells

[y-axis] Cytolysis (%)

Fig. 18

Target cells

[y-axis] Cytolysis (%)

Sequence Listings